



**Diane Raphaela  
Marques**

**Avaliação de perfil lipídico de células dendriticas  
imaturas e maduras.**



**Diane Raphaela  
Marques**

**Avaliação de perfil lipídico de células dendríticas  
imaturas e maduras**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Biomoléculares, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria do Rosário Marques Domingues Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Maria Teresa de Teixeira Cruz Rosete Professor Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Dedico este trabalho aos meus pais e ao Rui pelo apoio incondicional.

## **o júri**

presidente

**Prof. Doutor Francisco Manuel Lemos Amado**

professor associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Maria Amália da Silva Jurado**

professora auxiliar do Departamento de Bioquímica da Universidade de Coimbra

**Prof. Doutora Maria do Rosário Gonçalves Reis Marques Domingues**

professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Maria Teresa Teixeira Cruz Rosete**

professora auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

## **agradecimentos**

Desejo expressar os meus mais sinceros agradecimentos às minhas orientadoras, Professora Rosário Domingues e Professora Teresa Cruz pelos seus ensinamentos, orientação científica, incentivos, disponibilidade, confiança depositada e apoio ao longo da realização deste trabalho, bem como pelos esforços orientados na obtenção de todo o suporte material e pela revisão crítica do manuscrito.

A todos os colegas do grupo pela amizade e companheirismo, compreensão e incentivo, entre ajuda laboratorial e a permanente disponibilidade. Em especial à Cláudia e à Beta por todos os desabafos, ajudas preciosas, comentários pertinentes, e partilha do trabalho. À Cristina por toda a ajuda, conselhos, ensinamentos e extrema paciência. Às meninas e ao menino da salinha pelos bons momentos e gargalhadas, e claro pela ajuda técnica a nível da informática...

A todos os meus amigos e família que “sobreviveram” a todas as crises e a infindáveis explicações sobre células e lípidos, esses seres que fazem parte de nós, mas que por muitas vezes me deixaram fora de mim. Em especial aos meus pequenotes por me trazerem imensa alegria, apesar da enorme saudade.

À minha avozinha e aos meus avós por serem a origem de tudo.

À minha mamã e à minha Faturinha, que me ouvem naqueles momentos de desespero.

Ao meu papá por todo o apoio e amor incondicional.

Ao Spy por ser ele mesmo.

E ao Rui por depois de tudo ainda me amar.

## palavras-chave

Células dendríticas, fosfolípidos, espectrometria de massa, lipidómica.

## resumo

Os fosfolípidos são os principais componentes das membranas celulares e têm um papel muito importante na estrutura e sinalização dos sistemas biológicos. A importância biológica dos fosfolípidos levou a um crescente interesse na caracterização do perfil lipídico de amostras biológicas e avaliação da sua variação em diferentes condições fisiológicas. A lipidómica é uma metodologia que engloba métodos separativos, como a cromatografia de camada fina ou cromatografia líquida de alta pressão, em associação com a espectrometria de massa, para obter informação sobre o perfil lipídico de células ou tecidos. Esta metodologia permite a identificação dos constituintes das diferentes classes dos fosfolípidos.

As Células Dendríticas (DC) são células do sistema imunitário, capazes de capturar, processar e apresentar antígenos aos linfócitos T, tendo assim um papel essencial na iniciação e modulação da resposta imunitária. O reconhecimento dos antígenos, tal como alérgenos e patógenos, pelas células dendríticas conduz à maturação das mesmas. As citocinas/quimiocinas são um dos principais mediadores na imunização mediada por DC, e mais recentemente tem-se tornado evidente que os mediadores lipídicos também desempenham um papel importante neste processo de imunização. O objectivo deste trabalho consiste na identificação do perfil lipídico das células dendríticas imaturas e maduras, quando expostas a agentes que induzem à maturação das DC, nomeadamente lipopolissacarídeo (LPS) e alérgenos de contacto, ou ainda quando expostas a irritantes, incapazes de activar o processo de maturação das DC. Inicialmente as diferentes classes de fosfolípidos presentes no extracto lipídico total foram separadas por TLC e posteriormente analisadas por ESI-MS e caracterizadas por espectrometria de massa tandem (ESI-MS/MS), permitindo assim identificar os detalhes estruturais e a composição dos fosfolípidos. A maioria dos fosfolípidos identificadas nos extractos de DC incluem fosfatidilcolinas (PC), fosfatidiletanolaminas (PE), fosfatidilinositois (PI), fosfatidilserinas (PS), fosfatidilglicerol (PG), esfingomielinas (SM) e ceramidas (Cer). Os resultados obtidos permitiram observar que estimulação das DCs por LPS e com químicos indutores de dermatite de contacto altera de um modo significativo, o perfil lipídico das DCs, essencialmente o perfil lipídico das classes das esfingomielinas e das ceramidas.

**keywords**

Dendritic cells, phospholipids, mass spectrometry, lipidomics.

**abstract**

Phospholipids (PLs) are the main components of cell membranes and play important roles in signalling in biological systems. The importance of PLs has led to an increase interest in the evaluation of the lipid profile from biological samples, trying to understand there variation in spite of the different physiological conditions. Lipidomics is a methodology encompasses separation methods such as thin layer chromatography or high pressure liquid chromatography in combination with mass spectrometry to obtain information on the lipid profile of cells or tissues. This methodology allows the identification of the constituents of different classes of phospholipids.

Dendritic cells (DC) are immune cells, able to capture, process and present antigens to T lymphocytes, thus playing a crucial role in initiation and modulation of immune response. Recognition of antigens, such as allergens and pathogen-associated molecular patterns, by dendritic cells (DCs) leads to DC maturation. It is being considered that besides cytokines/chemokines, lipid mediators may also have effects on the immunogenicity of DCs.

The aim of this study is to identify the profile of phospholipids in immature and mature dendritic cells and evaluate the changes that occur in PL profile of DC induced by the presence of LPS and skin allergens that trigger DC maturation. Different PL classes from lipid extract were initially separated by TLC and further analysed by ESI-MS and characterized by tandem mass spectrometry (ESI-MS / MS), allowing the identification of the detailed structure of PLs. Main PLs identified in DC extracts included phosphatidylcholines (PC), phosphatidylethanolamines (PE), phosphatidylinositols (PI), phosphatidylserines (PS), phosphatidylglycerol (PG), sphingomyelin (SM) and small amounts of ceramides (Cer). Generally the DCs stimulation with LPS and allergens, changes significantly the DCs lipidomics profile, from sphingomyelin and ceramides.

# Índice

Índice.....	1
1 Introdução.....	6
1.1 Células Dendríticas: Importância no sistema imunitário e processo inflamatório	6
1.2 Maturação e migração das células dendríticas .....	7
1.3 Interação entre DC e lípidos .....	11
1.4 Lípidos: estrutura e suas funções biológicas.....	12
1.5 Análise de lípidos A abordagem Lipidómica.....	14
1.5.1 Métodos de separação utilizados na análise de fosfolípidos .....	18
1.5.2 Cromatografia em camada fina .....	18
1.5.3 Espectrometria de massa na análise de lípidos.....	19
1.5.3.1 Método de ionização por Electrospray .....	21
1.5.3.2 Analisadores.....	23
1.5.4 Espectrometria de massa tandem .....	24
1.6 Objectivos do trabalho .....	25
2 Material e Métodos.....	28
2.1 Reagentes.....	28
2.2 Extração e separação de lípidos .....	30
2.3 Instrumentação .....	31
3 Avaliação do Perfil Lipídico de Células dendríticas imaturas e maduras por espectrometria de massa.....	34
3.1 Introdução .....	34
3.2 Análise do extracto lipídico total por ESI-MS e ESI-MS/MS directa .....	35
3.3 Análise das diferentes classes de lípidos por TLC, ESI-MS e ESI-MS/MS .....	40
3.4 Conclusões.....	73
4 Avaliação do Perfil Lipídico induzida por alergénios e irritantes .....	75
4.1 Introdução .....	75
4.2 Análise por ESI-MS e ESI-MS/MS directa do extracto lipídico total .....	76
4.3 Análise das diferentes classes de lípidos por TLC e ESI-MS e ESI-MS/MS.....	79
4.4 Conclusões.....	90
5 Conclusões .....	92
Referências Bibliográficas .....	94



## Índice de Figuras

Figura 1 : Funções imunológicas das DCs. Diferenciação e migração das DCs. (Szatmari and Nagy 2008) .....	7
Figura 2: Características morfológicas de DC imatura de humano de sangue periférico após isolamento imuno-magnético. (Wright-Giemsa, x 600) (Satthaporn and Eremin 2001) .....	10
Figura 3: Características morfológicas de DC madura de humano de gânglios linfáticos após isolamento imuno-magnético. (Wright-Giemsa, x 600) (Satthaporn and Eremin 2001) .....	10
Figura 4: Estruturas gerais e classes dos fosfolípidos. A classificação das classes baseia-se nas moléculas de X (Han and Gross 2005) .....	13
Figura 5: Estruturas gerais e classes dos esfingolípidos. A classificação das classes baseia-se nas moléculas de X. Glc, Gal e Neu5Ac representam glucose, galctose e ácido N-acetylneuraminico, respectivamente. (Han and Gross 2005) .....	14
Figura 6: Diagrama de Fluxo da metodologia lipidómica, adaptado de (Wenk 2005), (Wolf and Quinn 2008) e (Hu, van der Heijden et al. 2009) .....	16
Figura 7: Componentes característicos de um espectrómetro de massa .....	20
Figura 8: Representação esquemática do processo de <i>electrospray</i> (www.rsc.org). .....	22
Figura 9: Espectros de ESI-MS no modo positivo do extracto lipídico total obtido de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (após exposição a LPS).....	36
Figura 10: Espectro de ESI-MS de fosfolípidos totais extraídos de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS) no modo negativo .....	38
Figura 11: Cromatografia de camada fina (TLC) e revelação com primulina.....	41
Figura 12: Espectros de ESI-MS de fosfatidilcolinas separados por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS) no modo positivo .....	43
Figura 13: Espectros de ESI-MS/MS da PC 18:1/16:0 .....	45
Figura 14: Estrutura da fosfatidilcolina PC 18:1/16:0 e fragmentação característica da classe das PC [MH] <sup>+</sup> no modo positivo .....	46
Figura 15: Estrutura da fosfatidilcolina PC 18:1/16:0 e fragmentação característica da classe das PC [MNa] <sup>+</sup> no modo positivo .....	47
Figura 16: Espectros de ESI-MS/MS da PC O-16:0/18:1 [MH] <sup>+</sup> de m/z 746. ....	47
Figura 17: Espectros de ESI-MS/MS de [MNa] <sup>+</sup> de PC O-16:0/18:1 de m/z 768. ....	48
Figura 18: Estrutura da alquilacilfosfatidilcolina PC O-16:0/18:1 e fragmentação característica da classe das PC [MH] <sup>+</sup> no modo positivo.....	48
Figura 19: Estrutura da alquilacilfosfatidilcolina PC O-16:0/18:1 e fragmentação característica da classe das PC [MNa] <sup>+</sup> no modo positivo.....	49
Figura 20: Espectro de ESI-MS de fosfatidietanolaminas separados por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS) no modo positivo .....	50
Figura 21: Espectros de ESI-MS/MS da PE O-18:1/18:0 .....	52
Figura 22: Estrutura da fosfatidiletanolamina PE 18:0/18:1 e fragmentação característica da classe das PE [M+H] <sup>+</sup> no modo positivo.....	53

Figura 23: Estrutura da fosfatidiletanolamina PE 18:0/18:1 e fragmentação característica da classe das PE $[M+Na]^+$ no modo positivo .....	53
Figura 24: Espectro de ESI-MS/MS da PE O-20:0/16:1 $[M+H]^+$ de $m/z$ 732.....	54
Figura 25: Estrutura da alquilacilfosfatidiletanolamina PE O-20:0/16:1 e fragmentação característica da classe das PE $[M+Na]^+$ no modo positivo. ....	54
Figura 26: Espectro de ESI-MS de esfingomielinas separados por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS) no modo positivo .....	55
Figura 27: Espectros de ESI-MS/MS $[MH]^+$ de $m/z$ 703 correspondente à SM d18:1/16:0. ....	57
Figura 28: Espectro de ESI-MS/MS $[MNa]$ da SM d18:1/16:0 ( $m/z$ 725) .....	57
Figura 29: Estrutura da esfingomielina SM d18:1/16:0 e fragmentação característica da classe das SM no modo positivo $[MH]^+$ .....	58
Figura 30: Estrutura da esfingomielina SM d18:1/16:0 e fragmentação característica da classe das SM no modo positivo $[MNa]^+$ .....	58
Figura 31: Espectro de ESI-MS de ceramidas separados por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS) no modo negativo .....	59
Figura 32: Espectros de ESI-MS/MS do ião 536 $m/z$ (cer d18:1/16:0). ....	61
Figura 33: Estrutura da ceramida d18:1/16:0 e fragmentação característica da classe das cer no modo negativo .....	61
Figura 34: Espectro de ESI-MS de fosfatidilinositol separados por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS) no modo negativo .....	62
Figura 35: Espectros de ESI-MS/MS do ião 861 $m/z$ (PI 18:1/18:1) .....	63
Figura 36: Estrutura da fosfatidilinositol 18:1/18:1 e fragmentação característica da classe das PI no modo negativo .....	64
Figura 37: Espectro de ESI-MS de fosfatidilglicerol separados por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS) no modo negativo .....	65
Figura 38: Espectros de ESI-MS/MS do ião 773 $m/z$ (PG 18:1/18:1) .....	66
Figura 39: Estrutura da fosfatidilglicerol PG 18:1/18:1 e fragmentação característica da classe das PG no modo negativo.....	67
Figura 40. Espectro de ESI-MS de fosfatidilserinas separados por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS) no modo negativo .....	68
Figura 41: Espectro de ESI-MS/MS do ião $[M-H]^-$ da PS 18:1/18:0, de $m/z$ 788.....	69
Figura 42: Estrutura da fosfatidilserina PS 18:0/18:1 e fragmentação característica da classe das PS no modo negativo. ....	70
Figura 43: Metabolismo da esfingomielina e da ceramida.....	71
Figura 44: Espectro directo de ESI-MS de fosfolípidos extraídos de células dendríticas imaturas (controlo), maduras (LPS), expostas a alergénios (DNFB) e a irritantes (SDS) no modo positivo.....	76
Figura 45: Espectro de ESI-MS de fosfolípidos totais extraídos de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS), expostas a alergénios (DNFB) e a irritantes (SDS) no modo negativo .....	78
Figura 46: Placa de sílica após realização de TLC e revelação com primulina. ....	80

Figura 47: Espectro de ESI-MS de fosfatidilcolinas separados por TLC de células dendríticas imaturas (controlo), maduras (LPS), expostas a alergénios (DNFB) e a irritantes (SDS) no modo positivo.....	81
Figura 48: Espectro de ESI-MS de fosfatidietanolaminas separados por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS), expostas a alergénios (DNFB) e a irritantes (SDS) no modo positivo.....	82
Figura 49: Espectro de ESI-MS de esfingomielinas separados por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS), expostas a alergénios (DNFB) e a irritantes (SDS), no modo positivo.....	84
Figura 50: Espectro de ESI-MS de ceramidas separadas por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS), expostas a alergénios (DNFB) e a irritantes (SDS), no modo negativo. ....	85
Figura 51: Espectro de ESI-MS de fosfatidilinositol separadas por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS), expostas a alergénios (DNFB) e a irritantes (SDS), no modo negativo. ....	87
Figura 52: Espectro de ESI-MS de fosfatidilglicerol separadas por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS), expostas a alergénios (DNFB) e a irritantes (SDS), no modo negativo. ....	88
Figura 53: Espectro de ESI-MS de fosfatidilserinas separadas por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS), expostas a alergénios (DNFB) e a irritantes (SDS), no modo negativo. ....	89

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Fosfatidilcolinas pertencentes às DCs identificadas no modo positivo .....	44
Tabela 2: Fosfatidietanolaminas pertencentes às DCs identificadas no modo positivo ...	51
Tabela 3: Esfingomielinas pertencentes às DCs identificadas no modo positivo,.....	56
Tabela 4: Ceramidas pertencentes às DCs identificadas no modo negativo .....	60
Tabela 5: Fosfatidilinositois pertencentes às DCs identificadas no modo negativo .....	63
Tabela 6: Fosfatidilglicerol pertencentes às DCs identificadas no modo negativo.....	66
Tabela 7: Fosfatidilserina pertencentes às DCs identificadas no modo negativo .....	69

# **Capitulo 1**

## **Introdução**

# 1 Introdução

## 1.1 Células Dendríticas: Importância no sistema imunitário e processo inflamatório

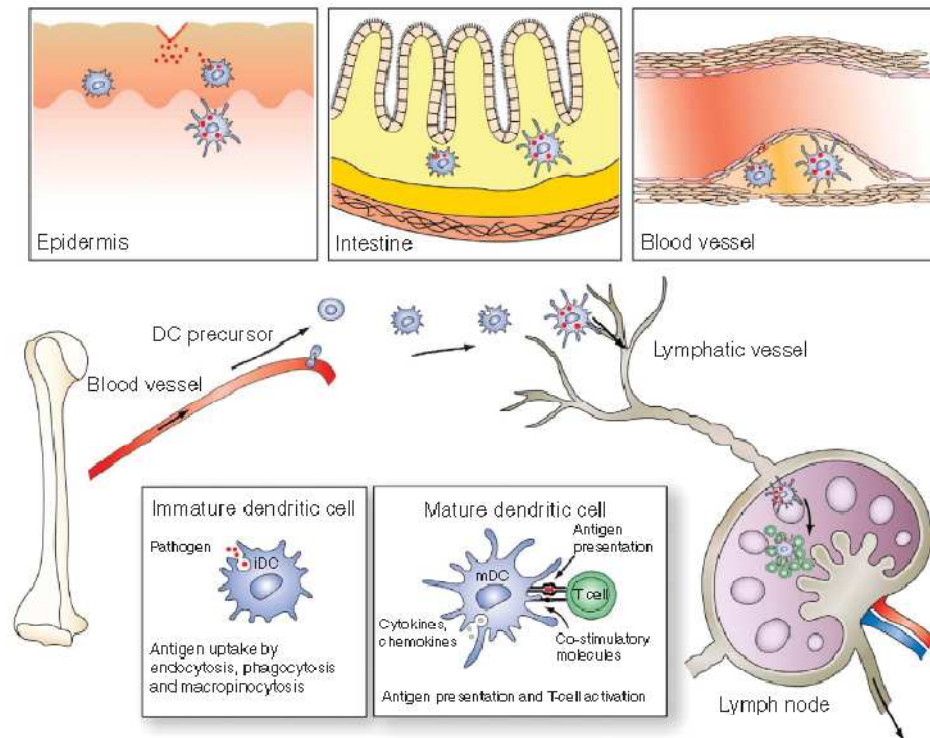
As células dendríticas (DCs) são células do sistema imunitário, cuja principal função é processar antígenos e apresentá-los às células T virgens (*naive*), comportando-se portanto como células apresentadoras de antígeno (APCs). As DC derivam de células de medula óssea e patrulham as mucosas, a pele e os órgãos internos do organismo à procura de antígenos. Nos tecidos não linfóides, as DCs encontram-se no estado imaturo, e são reactivas a sinais de alarme resultantes de um processo infeccioso, inflamatório ou de destruição de tecidos. O reconhecimento de antígenos nos tecidos periféricos confere-lhes a capacidade de migração para os gânglios linfáticos cuja finalidade consiste na apresentação dos antígenos às células T *naive*. Simultaneamente, expressam moléculas co-estimuladoras e citocinas que induzem a resposta imunitária primária e que determinam o tipo de resposta eficiente na neutralização dos antígenos.

As DCs estão classificadas em vários tipos, com base nas características específicas que apresentam, nomeadamente: as propriedades de migração, a expressão de marcadores de superfície, a sua localização no organismo, as funções específicas que desempenham e ainda de acordo com os estímulos inflamatórios e infecciosos que induzem a sua diferenciação/activação.

As DC formam uma população heterogénea de células e podem ser classificadas em DCs plasmocitóide e DCs mielóide. Estes dois tipos de células diferem essencialmente na distribuição que apresentam no organismo, na produção de citocinas e nas funções que desempenham. As DCs plasmocitóide localizam-se essencialmente nos órgãos linfóides e no sangue e desempenham um papel crucial na imunidade inata anti-viral e na autoimunidade. As DCs mielóide localizam-se no sangue e nos tecidos. No sangue este tipo de DC subdividem-se ainda em DCs inflamatórias e nos tecidos em células de *Langerhans* (utilizadas neste trabalho) e DC intersticiais. Nos tecidos periféricos, estão presentes em número reduzido, nomeadamente, a pele, os pulmões, o estômago e os intestinos, e em órgãos linfáticos. As DCs foram ainda identificadas nos espaços intersticiais da maioria dos tecidos humanos, com excepção da córnea e do sistema nervoso central.

## 1 Introdução

As DCs têm suscitado crescente interesse científico e clínico devido ao papel crucial que desempenham nas respostas imunológicas, designadamente em terapias de cancro, como adjuvantes em vacinas biológicas, e ainda nos processos de autoimunidade. (Satthaporn and Eremin 2001),(Lambrecht, Hoogsteden et al. 2001)



**Figura 1 : Funções imunológicas das DCs. Diferenciação e migração das DCs. (Szatmari and Nagy 2008)**

### 1.2 Maturação e migração das células dendríticas

As células dendríticas derivadas da medula óssea circulam no sangue como células precursoras, podendo migrar para os tecidos não linfóides e aí residirem como células dendríticas imaturas. As células intersticiais e as células de *Langerhans* são exemplos de DC imaturas que se localizam em zonas de interface com o ambiente externo. As células dendríticas imaturas (iDCs) são altamente endocíticas, ao contrário das DC maduras (DCm) que perderam esta capacidade, e processam antígenos endógenos (sintetizados na própria célula) ou antígenos exógenos (captados do ambiente extracelular). As fontes de antígenos exógenos incluem bactérias, vírus, células apoptóticas ou necróticas, proteínas de choque térmico, e complexos imunes. Os

mecanismos envolvidos na captação dos antígenos pelas células dendríticas são diversos, e incluem a fagocitose através de receptores membranares, a endocitose, mediada por receptores Fc e por receptores de lectina tipo C, e a pinocitose.

As iDC usam vários mecanismos na captação dos antígenos. Podem apropriar-se de partículas ou microrganismos por fagocitose, podem formar vesículas que contêm solutos e fluido extracelular, por um processo denominado macropinocitose. Podem ainda expressar receptores que medeiam endocitoses adsorptivas, mediada por receptores Fc e por receptores de lectina tipo C. A macropinocitose e o reconhecimento de antígenos mediado por receptores é muito eficiente, pois apenas requer concentração muito baixas de antígenos, na ordem de grandeza picomolar ou nanomolar, bastante inferior aos níveis tipicamente requeridos por outras APCs. Após captação de antígenos, as DC abandonam os tecidos periféricos, entram nos vasos linfáticos aferentes e migram para os gânglios linfáticos onde interagem com os linfócitos T virgens (*naïve*) e iniciam uma resposta imunológica específica. A migração das DC ocorre em simultâneo com a sua maturação, que se traduz pela produção de citocinas, quimiocinas e pela expressão aumentada de moléculas envolvidas numa eficiente apresentação de antígenos (Ag) aos linfócitos T.

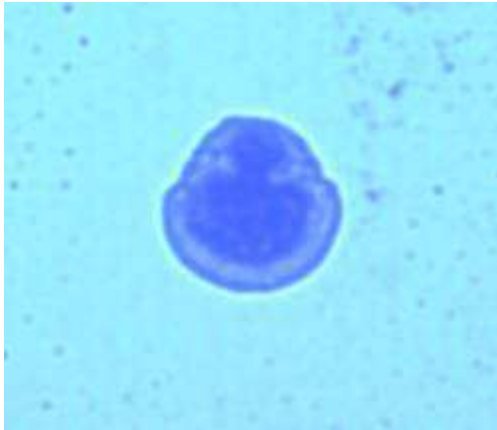
O recrutamento das DC imaturas para os tecidos periféricos é desencadeado por progenitores hematopoieticos de células de medula óssea. Inicialmente estes progenitores transformam-se em DC imaturas (iDCs) que patrulham as superfícies corporais e os espaços intersticiais. As DCs imaturas são recrutadas para os locais de inflamação nos tecidos periféricos após a invasão de agentes patogénicos. O reconhecimento destes antígenos induz a maturação e migração das DC dos tecidos periféricos para órgãos linfóides. As DC imaturas possuem uma elevada competência para a captação de antígenos, baixo potencial de activação de células T, isto é, reduzida capacidade imunoestimuladora, desenvolvem uma resposta rápida a citocinas inflamatórias, e caracterizam-se ainda por acumularem, ao nível intracelular, moléculas do complexo *major* de histocompatibilidade (MHC). O reconhecimento de antígenos virais e bacterianos é desencadeado por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), tal como os receptores *toll-like* (TLRs). Os TLRs reconhecem estruturas invariáveis existentes na superfície celular dos microrganismos e denominadas de padrões moleculares associados a agentes patogénicos (PAMPs). Um destes PAMPs é o lipopolissacarídeo (LPS), um ligando do TLR4 que induz a maturação das DC e que será utilizado neste trabalho, e portanto, abordado posteriormente.

## 1 Introdução

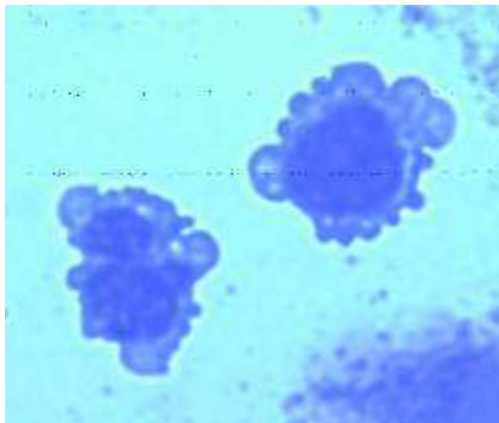
O processamento de antígenos pelas células dendríticas ocorre essencialmente através de duas vias: uma via exógena ou endossómica (para antígenos exógenos), e uma via endógena ou proteassómica (para antígenos endógenos), em que os antígenos são acoplados a moléculas MHCII e MHCI, activando células  $CD4^+$  (Th) e  $CD8^+$  (CTL), respectivamente. Apesar de durante muito tempo se pensar que a via proteassómica processava apenas antígenos sintetizados dentro das APC, designadamente antígenos tumorais e polipeptídeos provenientes de vírus sintetizados no interior das DC durante uma infecção, actualmente sabe-se que antígenos exógenos podem sofrer também degradação no proteassoma e em seguida migrar para o retículo endoplasmático para serem acoplados às moléculas MHCI, tal como os antígenos endógenos. Este processo é denominado de apresentação cruzada de antígenos (*cross-presentation*) (Heath e Carbone, 2001 a; Mellman e Steinman, 2001) e ocorre apenas nalgumas células, designadamente nas DC.

A capacidade das DCs regularem a resposta imunológica depende da maturação destas mesmas células. Esta maturação pode ser induzida por vários factores, designadamente o LPS já referido anteriormente, citocinas inflamatórias, ligação a receptores de superfície celular seleccionados (ex. CD40), e ainda produtos virais (RNA viral de dupla cadeia). Durante o processo de maturação, as DCs sofrem alterações funcionais e fenotípicas, que se caracterizam por: redistribuição das moléculas do complexo major de histocompatibilidade (MHC), que passam dos compartimentos intracelulares endocíticos para a superfície das DCs; aumento da expressão superficial de moléculas co-estimuladoras tais como CD40, CD80 e CD86, que ampliam a adesão aos linfócitos e sinalização; alterações morfológicas e reorganização do citoesqueleto, secreção de quimiocinas, citocinas (IL-12, TNF e IFN- $\beta$ ) e proteases; e ainda expressão á superfície de moléculas de adesão e de receptores de quimiocinas (Figura 2 e Figura 3).





**Figura 2: Características morfológicas de DC imatura de humano de sangue periférico após isolamento imuno-magnético. (Wright-Giemsa, x 600) (Satthaporn and Eremin 2001)**



**Figura 3: Características morfológicas de DC madura de humano de gânglios linfáticos após isolamento imuno-magnético. (Wright-Giemsa, x 600) (Satthaporn and Eremin 2001)**

Depois de estimuladas, as mDC migram para os órgãos linfáticos onde interagem com as células T e B de modo a iniciar e modular a resposta imunológica adaptativa. Sendo a maturação das DCs crucial para ocorrer uma resposta imunológica eficiente. Esta migração é regulada pela interacção entre quimiocinas, proteases e os respectivos receptores.

Nos órgãos linfóides secundários, nomeadamente nódulos linfáticos, as DC apresentam os complexos antígeno-MHC às células T virgens  $CD4^+$  (Th) e  $CD8^+$  (CTL). As células T virgens  $CD4^+$  diferenciam-se em células T auxiliar efectoras e de memória, que apoiam a diferenciação e expansão das  $CD8^+$  e das células B. As células T auxiliares exercem actividade anti-tumoral indirectamente através da activação de células

importantes, tais como macrófagos e células T citotóxicas, capazes de eliminar células tumorais e células infectadas por vírus.

A poderosa actividade adjuvante que as DC possuem na estimulação de respostas celulares específicas por parte dos linfócitos tem contribuído para o desenvolvimento de estratégias imuno-terapêuticas, designadamente de vacinas anti-microbianas potentes, e estratégias que visam a estimulação de respostas anti-tumorais. Por outro lado, o facto de as DC promoverem tolerância periférica tem contribuído para a sua utilização terapêutica no bloqueio de respostas imunológicas que medeiam reacções alérgicas, doenças auto-imunes e rejeição de transplantes.

### **1.3 Interacção entre DC e lípidos**

A existência de subpopulações distintas de DC (DC mielóide, plasmacitóide, células de *Langerhans*) é acompanhada por uma inerente plasticidade funcional e fenotípica destas células, sensível a alterações do microambiente, que modulam as suas propriedades imunológicas. Para além de citocinas / quimiocinas, os mediadores lipídicos exógenos e/ou produzidos pelas próprias DC, exercem também efeitos profundos sobre a imunogenicidade destas células DCs. Alguns destes mediadores lipídicos actuam através de receptores nucleares presentes nas DC e têm uma função essencial na modulação das respostas imunológicas mediadas pelos linfócitos T.

No corpo humano as DCs estão expostas a grandes quantidades de lípidos, designadamente no tecido linfóide associado ao intestino, onde os lípidos provenientes da alimentação, ácidos gordos e colesterol são abundantes. As DCs têm como principal função o processamento e captação de antígenos derivados de proteínas, no entanto também podem apresentar antígenos lipídicos/glicolipídicos, derivados de microrganismos, através das moléculas de superfície celular CD1. As moléculas CD1 pertencem a uma família de proteínas que formam heterodímeros com a microglobulina- $\beta 2$ , são estruturalmente semelhantes às moléculas MHCI e possuem baixo polimorfismo. Esta família de proteínas está classificada em dois grupos distintos: o grupo I que engloba as proteínas CD1a, CD1b, CD1c e o grupo II que inclui a molécula CD1d. A molécula CD1d é crucial na apresentação de glicolípidos específicos (ceramidas galactosiladas) às células NKT, células produtoras de citocinas e envolvidas na regulação de doenças infecciosas, auto-imunes e tumorais.

Estes resultados evidenciam o envolvimento do ambiente lipídico local na capacidade apresentadora de antígenos das DCs. De referir ainda que estudos recentes evidenciam o papel sinalizador de mediadores lipídicos na maturação e imunogenicidade das DC (Sztamari and Nagy 2008)

Contudo, a forma como os lípidos endógenos são reconhecidos pelas DC, os mecanismos de sinalização que activam ao nível intracelular e ainda a modulação do perfil lipídico das DCs durante a sua maturação permanece por esclarecer. O objectivo deste trabalho consiste precisamente no estudo da modulação do perfil lipídico das DC durante o processo de maturação induzido por diferentes compostos, nomeadamente LPS e alérgenos de contacto.

### ***1.4 Lípidos: estrutura e suas funções biológicas***

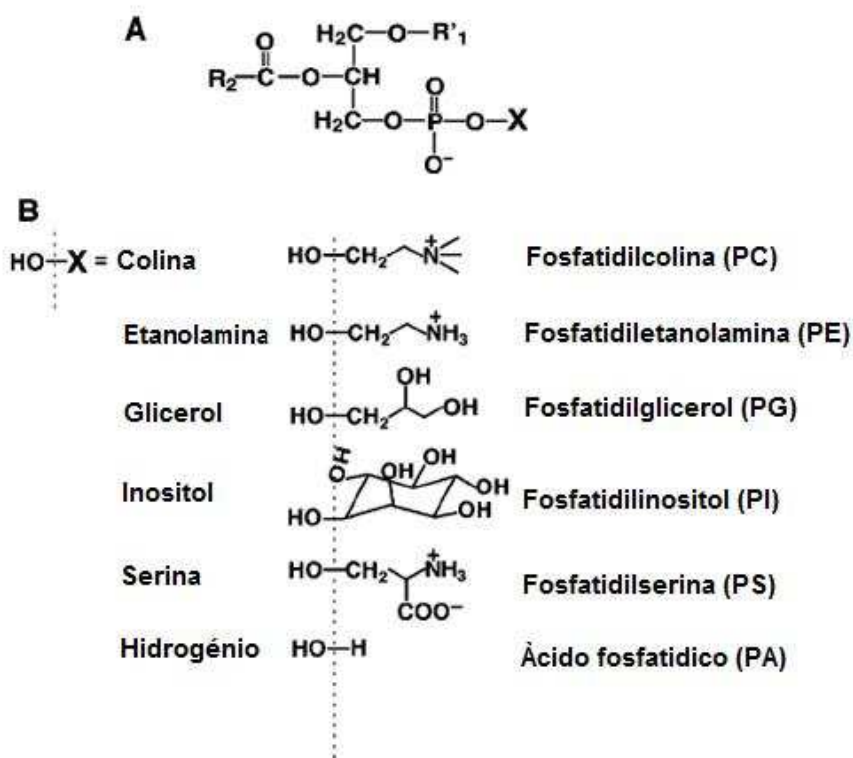
Os lípidos são constituintes celulares essenciais que desempenham vários e distintos papéis nas funções celulares. A maioria dos lípidos das células forma uma camada bilipídica cujas características são essenciais para a integridade estrutural membranar e funcionalidade celular. Os lípidos fornecem ainda um ambiente hidrofóbico apropriado às funções e interações das proteínas membranares e servem como armazenamento energético, de fácil e rápido acesso. Finalmente, os lípidos membranares são ainda uma fonte precursora de mediadores lipídicos. Há uma grande diversidade de lípidos que participam em funções de sinalização celular.

Os lípidos podem dividir-se em 2 grandes grupos: lípidos não-polares (essencialmente colesterol e seus derivados) e lípidos polares. Este último grupo compreende predominantemente fosfolípidos e esfingolípidos.

Na maioria das células dos mamíferos, os fosfolípidos representam aproximadamente 60% dos lípidos totais, os esfingolípidos compreendem sensivelmente 10% dos lípidos totais e a percentagem restante corresponde aos lípidos não-polares, tal como o colesterol.

Os fosfolípidos são os constituintes principais das membranas celulares e têm como característica a presença de pelo menos um grupo fosfato na posição sn-3 do glicerol. São moléculas anfipáticas, isto é, a cabeça constituída pelo grupo fosfato é polar ou hidrofílica e a cauda constituída pelas cadeias de ácidos gordos é apolar ou hidrofóbica. Estas características fazem dos fosfolípidos estruturas singulares, que permitem estabelecer a estrutura organizada das membranas celulares. Baseado nas

diferenças dos grupos (X -Figura 4) que estão ligadas ao grupo fosfato, os fosfolípidos podem ser organizados em diferentes classes. Por exemplo, se X for uma colina ou uma etanolamina, então esse fosfolípido corresponde, respectivamente, à classe das PC (fosfatidilcolina) ou das PE (fosfatidiletanolamina). Dentro da mesma classe podemos ainda distinguir as espécies através dos diferentes ácidos gordos ( $R_1$  e  $R_2$ -Figura 4).



**Figura 4: Estruturas gerais e classes dos fosfolípidos. A classificação das classes baseia-se nas moléculas de X (Han and Gross 2005)**

O segundo conjunto maior de lípidos polares são os esfingolípidos, estes contêm a esfingosina como cadeia principal e é esta a característica comum do grupo. Baseado na natureza da ligação covalente entre as diferentes moléculas polares possíveis (X - Figura 5) e a esfingosina, os esfingolípidos podem ser classificados como ceramidas, esfingomielinas, cerebrósidos ou ainda outros glicosfingolípidos. Dentro da mesma classe podemos ainda distinguir as espécies através dos diferentes ácidos gordos ( $R_1$  - Figura 5) (Han and Gross 2005)

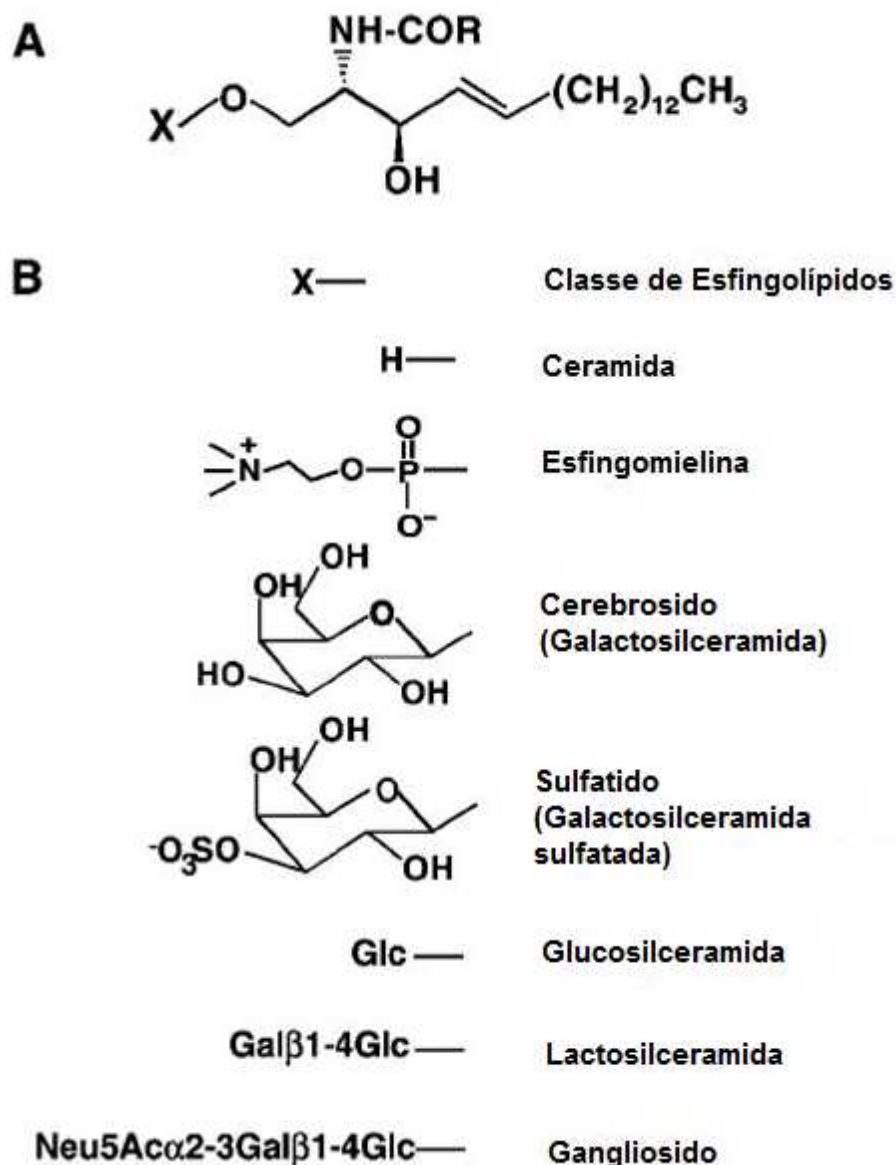


Figura 5: Estruturas gerais e classes dos esfingolípido. A classificação das classes baseia-se nas moléculas de X. Glc, Gal e Neu5Ac representam glucose, galctose e ácido N-acetylneuraminico, respectivamente. (Han and Gross 2005)

### 1.5 Análise de lípidos A abordagem Lipidómica

Lipidómica, é por conceito o estudo sistemático dos lípidos e das suas funções em sistemas biológicos (Zehethofer and Pinto 2008). Isto é, examina extensivamente as classes de lípidos, quer qualitativamente quer quantitativamente, em relação a alterações de metabolismo, transdução de sinal e apoptose (Kim, Ahn et al. 2008).

## 1 Introdução

Graças ao seu papel biológico, os lípidos foram uma área de investigação intensa na década de 60, no entanto, e devido às limitações das técnicas analíticas, a evolução desta área de investigação foi bastante mais lenta relativamente aos avanços efectuados nas áreas da biologia molecular, genómica e proteómica (Oresic, Hanninen et al. 2008). Assim, apesar de a lipidómica ser um campo já conhecido da pesquisa biomédica e a sua importância amplamente reconhecida, o seu nome só foi recentemente salientado (Wenk 2005).

Lipidómica é a área de investigação que estuda as vias metabólicas e funções dos lípidos em sistemas biológicos, em grande escala. Envolve a identificação e quantificação de milhares de moléculas lipídicas e as suas interacções com outros lípidos, proteínas e outras moléculas in vivo, a sua função, interacções e dinâmica bem como as alterações que ocorrem durante perturbações fisiopatológicas (Watson 2006). Embora a lipidómica esteja sob o abrigo de um campo mais geral chamado "metabolómica" visto que os lípidos são metabolitos biológicos, esta é em si uma disciplina distinta, devido à singularidade e especificidade funcional de lípidos em relação a outros metabolitos.

Diversas tecnologias modernas (incluindo a espectrometria de massa (MS), ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de fluorescência, cromatografia em coluna e dispositivos microfluídicos) têm sido usadas em lipidómica. O progresso da lipidómica moderna tem sido bastante acelerado pelo desenvolvimento de técnicas de ionização suave de espectrometria de massa (ou seja, de ionização por electrospray e MALDI) (Han 2009, June 15),

A estratégia subjacente à metodologia lipidómica, como se resume no esquema da Figura 6 envolve, em primeiro lugar, o isolamento de membranas morfologicamente distintas ou subfracções e em segundo lugar, a extracção destes lípidos livres das proteína da membrana e de outros componentes. Uma vez extraídos, os lípidos devem então ser fraccionados, o que geralmente necessita de um processo multi-passo de cromatografia, para permitir a identificação e quantificação de cada espécie molecular (Wolf and Quinn 2008).

## Estudo do perfil Lipídico de Células Dendríticas

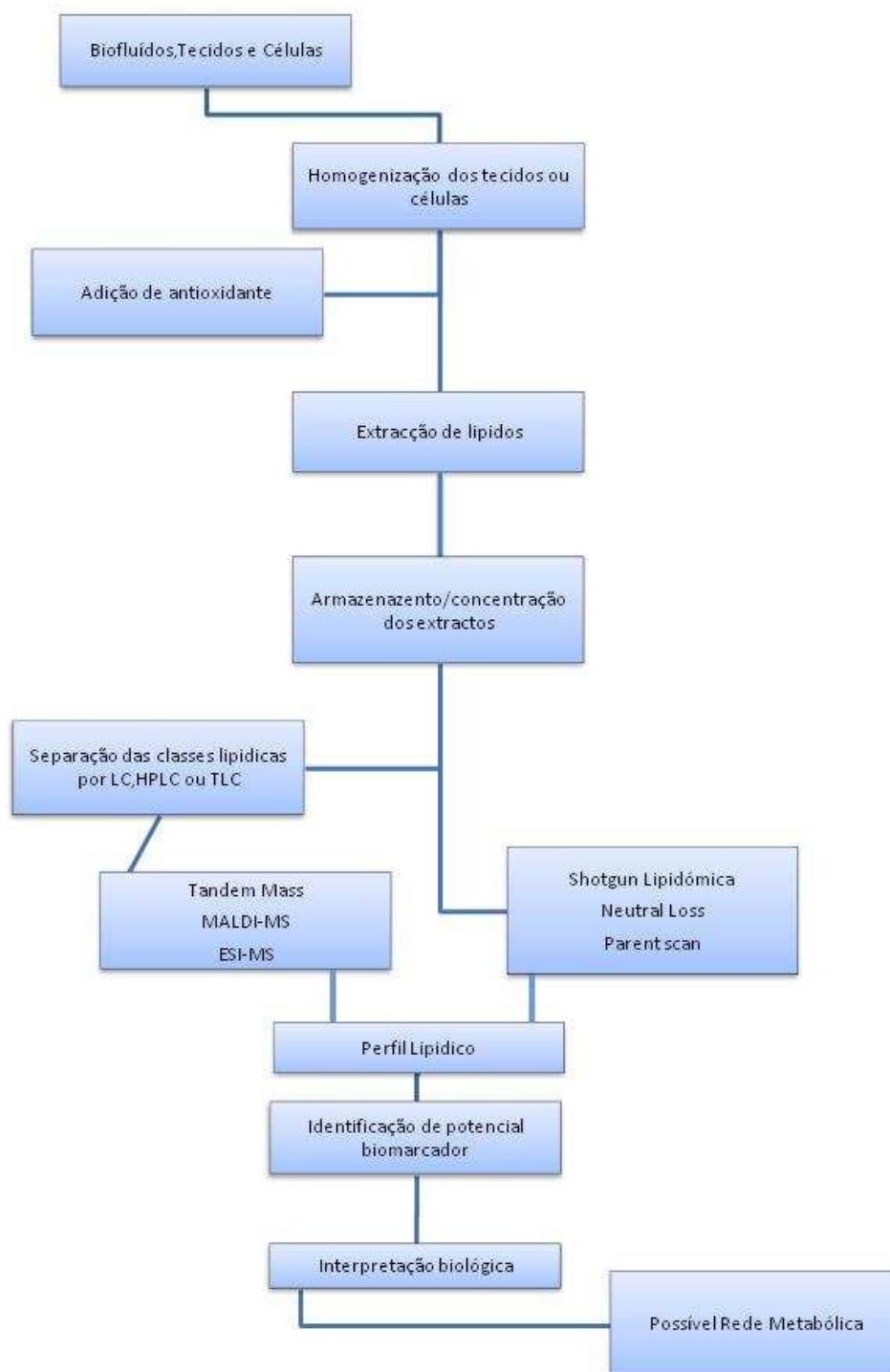


Figura 6: Diagrama de Fluxo da metodologia lipidômica, adaptado de (Wenk 2005), (Wolf and Quinn 2008) e (Hu, van der Heijden et al. 2009)

## 1 Introdução

O crescimento da lipidómica resulta principalmente da evolução tecnológica em espectrometria de massa. A análise lipídica é tradicionalmente realizada por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC-MS), no entanto, o desenvolvimento da ionização por electrospray (ESI) e do matrix-assisted laser desorption /ionization (MALDI) expandiu significativamente o intervalo de lípidos que podem ser analisados por espectrometria de massa, e o acoplamento de ESI-MS a cromatografia líquida (LC) aumentou consideravelmente o número de classes de lípidos que podem ser analisados numa única experiência. Além disso, a espectrometria de massa tandem (MS/MS) fornece as informações detalhadas necessárias para a caracterização estrutural de novos lípidos e a selectividade necessária para a determinação das espécies lipídicas presentes em misturas complexas (Zehethofer and Pinto 2008).

Devido á variedade de funções biológicas que os lípidos possuem, tais como a formação de membranas celulares, armazenamento de energia e sinalização celular, é de esperar que reflectam parcialmente o estado metabólico do organismo na ausência e na presença de patologias. Além disso, muitos estudos têm demonstrado que distúrbios metabólicos de lípidos podem levar a várias doenças humanas, incluindo a diabetes, a obesidade, arteriosclerose, doenças cardíacas e lesões cerebrais. Assim sendo, a análise das alterações dos metabolitos lipídicos de certas espécies moleculares em amostras biológicas será extremamente promissor na identificação de metabolitos lipídicos indicativos de transtornos metabólicos ou doenças. Este é um campo de pesquisa activo na metabolómica lipídica (lipidómica) (Hu, van der Heijden et al. 2009).

Recentemente, muitos estudos têm demonstrado que a lipidómica é essencial na determinação de novas espécies lipídicas que servem como potenciais biomarcadores de muitas doenças (Hu, van der Heijden et al. 2009). Para além das aplicações em doenças humanas, a estratégia da lipidómica direccionada para a descoberta de biomarcadores tem sido também utilizada em áreas da nutrição e ainda para a promoção da saúde e prevenção de doenças (Hu, van der Heijden et al. 2009).



### **1.5.1 Métodos de separação utilizados na análise de fosfolípidos**

Uma vez que os fosfolípidos obtidos de extractos de amostras biológicas incluem espécies de diferentes classes, é necessário uma separação.

Todos os sistemas de cromatografia consistem numa fase estacionária e uma fase móvel. A amostra é colocada na fase estacionária que pode ser líquida ou sólida, e a fase móvel que pode ser líquida ou gasosa, passa sobre este sistema (fase estacionária+amostra). Os componentes da amostra serão separados com base nas suas características físicas e químicas, e segundo a diferente afinidade para com as duas fases.

Os métodos de separação mais frequentemente utilizados em fosfolípidos são a cromatografia líquido-líquido em camada fina (TLC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O TLC é uma técnica mais antiga, mas que nunca deixou de ser utilizada, apesar das vantagens trazidas com o aparecimento do HPLC. A cromatografia gasosa (GC) permite a identificação dos ácidos gordos presentes nos fosfolípidos, mas em regra não é utilizada para separar e caracterizar fosfolípidos. Neste trabalho iremos fazer uma breve abordagem acerca do TLC, uma vez que foi utilizado neste trabalho (Peterson and Cummings 2006)

### **1.5.2 Cromatografia em camada fina**

A cromatografia em camada fina ou TLC (do inglês: *thin layer chromatography*) é uma técnica utilizada para analisar, identificar ou separar os componentes de uma mistura. Para a separação de lípidos são utilizadas placas de vidro geralmente já com a fase estacionária aplicada. O revestimento mais comum é a sílica gel, embora a alumina também seja frequente.

A cromatografia de camada fina é uma técnica de adsorção em que é utilizada uma fase móvel, composta por um líquido (eluente) e uma fase estacionária sólida em que as moléculas do eluente competem com as moléculas do soluto (amostra) por sítios de ligação na fase estacionária. A retenção das substâncias ocorre devido a adsorção sofrida na superfície da fase estacionária. A eluição ocorre quando o eluente desloca a amostra da fase estacionária. Assim, a mistura é aplicada na placa coberta com a fase estacionária e posteriormente colocada numa câmara cromatográfica contendo a fase móvel. Esta fase móvel sobe por capilaridade e arrasta a substância menos adsorvida

separando-a das substâncias mais adsorvidas. Estas diferenças de retenção da amostra estão associadas à sua polaridade.

Os fosfolípidos migram na fase estacionária uma certa distância segundo a sua composição e a afinidade com a fase móvel. A fase móvel consiste num sistema de solventes que varia em termos de polaridade. A maior parte dos sistemas incorpora proporções variáveis de clorofórmio, metanol e água. Trietilamina, etanol, hexano e isopropanol também são solventes comuns da fase móvel.

Após a eluição é necessário aplicar um reagente de detecção de forma a visualizar os fosfolípidos. Neste trabalho utilizamos a primulina, que permite a detecção por excitação dos compostos com a lâmpada de UV ( $\lambda=254$  nm).

O TLC permite uma separação das classes fosfolipídicas rápida e relativamente barata., é por isso frequentemente utilizada antes da detecção por espectrometria de massa (Peterson and Cummings 2006).

### ***1.5.3 Espectrometria de massa na análise de lípidos***

A espectrometria de massa é uma técnica analítica poderosa, que pode ser utilizada na identificação de compostos desconhecidos. Através desta técnica é possível detectar compostos em concentrações muito baixas em misturas quimicamente complexas, visto que a identificação pode ser feita em quantidades muito pequenas.

A espectrometria de massa tem desempenhado um papel fundamental no estudo dos processos bioquímico dos lípidos, isto porque esta técnica permite não apenas a detecção e determinação das estruturas destas moléculas mas também a sua quantificação. A combinação da sensibilidade, especificidade, selectividade e rapidez faz da espectrometria de massa uma técnica ideal para a análise de lípidos.

Os espectrómetros de massa constam de quatro partes básicas (Figura 7): um sistema de manipulação para introduzir a amostra no equipamento; uma fonte de iões, na qual é produzido um feixe de iões resultantes das moléculas de analito proveniente da amostra; um analisador que separa iões de acordo com a sua razão massa/carga ( $m/z$ ); e um detector, no qual os iões separados são recolhidos e caracterizados. O detector está ligado a um computador que permite integrar a informação recebida e transforma-la num espectro de massa, este apresenta os produtos de massa iónica na abcissa (valores de

$m/z$  - razão massa carga do ião), e na ordenada, a abundância relativa desses mesmo iões, depois de uma normalização relativamente aos iões de maior abundância. Uma característica importante do espectrómetro é o alto vácuo presente no instrumento ( $10^{-5}$ - $10^{-7}$  Torr) que permite o percurso livre dos iões pelo espectrómetro sem que ocorram reacções ou alterações dos iões.

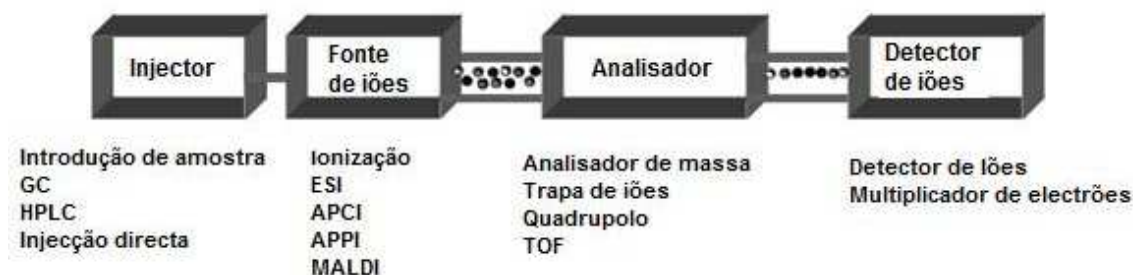


Figura 7: Componentes característicos de um espectrómetro de massa

Componentes característicos de um espectrómetro de massa geralmente inclui um injetor para introduzir a amostra, uma fonte de iões para ionizar a solução, um analisador para separar os compostos com base na razão  $m/z$  e um detector de iões ((Milne, Ivanova et al. 2006)).

Ao longo do tempo, têm surgido diferentes métodos de ionização e diferentes tipos de analisadores. O primeiro método de ionização a surgir, foi o impacto electrónico (EI) e mais tarde a ionização química (CI), que só são aplicáveis a compostos voláteis e termicamente estáveis. Para ultrapassar esta limitação surgiu a ionização por bombardeamento com átomos ou iões rápidos (FAB) que permitiu a análise por espectrometria de massa (MS) de amostras não voláteis e termicamente instáveis. Mais recentemente surgiu o *electrospray* (ESI) e a ionização por desorção por laser assistida por matriz (MALDI), usados hoje em dia para análise de biomoléculas.

Para alguns investigadores, a análises de fosfolípidos era considerada uma área difícil de trabalhar, porque ao contrário das proteínas, os fosfolípidos têm ligações muito específicas, o que faz com certas técnicas que são aplicadas ao ADN e proteínas, não sejam aplicadas aos fosfolípidos. O desenvolvimento da espectrometria de massa por FAB, permitiu a análise de fosfolípidos naturais. A partir daí foi possível analisar directamente estruturas fosfolipídicas intactas e preservar a informação inerente à sua estrutura química. Contudo tinha alguns problemas associados, como as complicações

do espectro com iões da matriz e a decomposição dos iões moleculares durante a ionização. Com o aparecimento do ESI, um método de ionização mais suave que o FAB, além de estes problemas ficarem resolvidos, o nível de sensibilidade na detecção de fosfolípidos foi aumentado. A sensibilidade foi também uma característica importante obtida com os novos instrumentos detentores de novos analisadores e associação de analisadores, nomeadamente o *Ion Trap* e o *Q-TOF*.

O método ESI é o mais usado na análise de fosfolípidos por estes serem moléculas com pesos moleculares relativamente baixos, entre 600 e 1000 Da, e será aqui abordado em detalhe, por ser o método de ionização a ser utilizado no decurso deste trabalho (Milne, Ivanova et al. 2006),(Pulfer and Murphy 2003), (Edmond de Hoffmann 2007)

### **1.5.3.1      *Método de ionização por Electrospray***

O método de ionização por *Electrospray* (ESI) é uma das técnicas de ionização com mais vasta utilização. ESI-MS foi inicialmente desenvolvido por Fenn e os seus colegas para análise de biomoléculas.

Assim, a substância a ser estudada está dissolvida num solvente que normalmente é muito mais volátil do que o analito, e de seguida esta solução é injectada na fonte através de um capilar, de metal, num fluxo contínuo, por acção de uma bomba de seringa. De seguida é aplicada uma diferença de potencial na agulha metálica, que provoca a formação de um cone de líquido na sua ponta, conhecido como cone de Taylor em que a solução é empurrada para fora do capilar e forma um aerossol em forma de pequenas gotas. Um gás não carregado, como o azoto é frequentemente utilizado para ajudar a formação do spray de pequenas gotas, e também à evaporação do solvente das gotículas. O solvente ao evaporar, torna as gotas mais pequenas e força as moléculas do analito, a juntar-se, o que vai fazer com que estas se repelem e partam as gotículas. O processo repete-se até que o analito fica sem solvente nenhum, ficando apenas o analito em forma de ião. Os iões carregados são então extraídos para os analisadores e analisados, por espectrometria de massa (Figura 8).

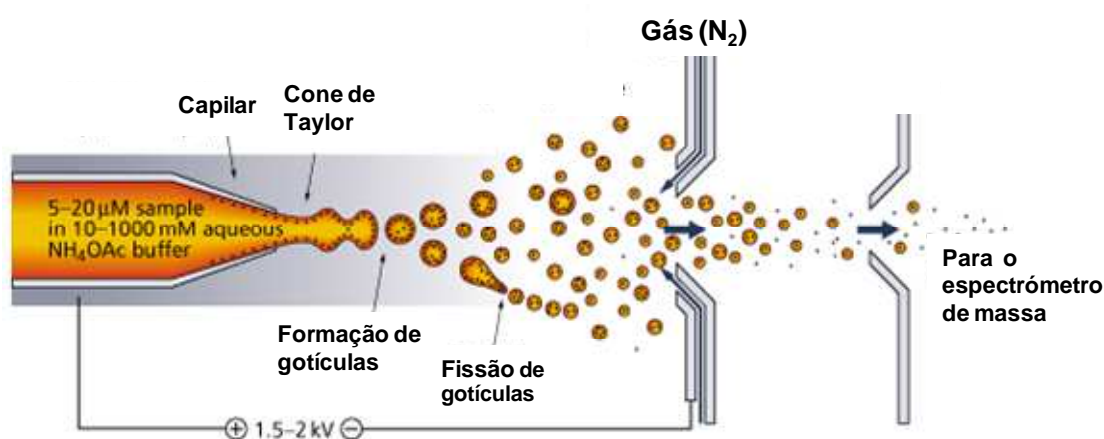


Figura 8: Representação esquemática do processo de *electrospray* ([www.rsc.org](http://www.rsc.org)).

Os espectrómetros de massa variam na sua fonte de ionização e no analisador. As fontes dos espectrómetros de massa estão em geral situadas numa região de vácuo. No caso de fonte de ionização por *electrospray* esta encontra-se à pressão atmosférica, permitindo a evaporação do solvente por intermédio de um fluxo corrente de um gás, em geral, azoto. Os iões gerados são depois transferidos desta zona de alta pressão para a zona de alto vácuo do analisador de massa.

Esta técnica tem três características principais que permitem fazer uma distinção dos outros métodos de ionização. Em primeiro, visto que o *electrospray* é uma técnica de ionização suave, permite que as interações não covalentes entre moléculas que existam em solução sejam preservadas na fase gasosa. A segunda característica é que tem a capacidade de produzir iões multiplamente carregados, com números de cargas elevado, reduzindo assim a razão  $m/z$ , característica importante para compostos de alto peso molecular, como no caso de proteínas. Desta forma é possível analisar compostos de elevada massa molecular até centenas de kDa. Por fim, o facto de que as amostras a analisar devem ser introduzidas em solução, faz com seja possível o acoplamento com muitas técnicas de separação, de que se destaca a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – do inglês: *high performance liquid chromatography*). (Han and Gross 2005), (Milne, Ivanova et al. 2006), (Edmond de Hoffmann 2007).

### 1.5.3.2 Analisadores

As fontes de ionização por electrospray podem ser combinadas com diferentes analisadores de massa, tal como o ion trap, o quadrupolo, tempo de voo (TOF) e o Fourier transform ion cyclotron (FT-ICR). Todos eles diferem na precisão (o erro na determinação da massa exacta comparada com o valor teórico), e na resolução (valor da massa dividido pela diferença de massas entre dois iões com uma pequena diferença de massa). Os espectrómetros de massa mais usados hoje em dia juntamente com o ESI são o quadrupolo, linear ion trap (LIT), quadrupolo ion trap (QIT) e o tempo de voo.

Neste trabalho foram utilizados dois espectrómetros diferentes, o ESI-Ion Trap e o ESI-Q-TOF 2. Estes aparelhos utilizam o mesmo método de ionização (ESI), no entanto, diferentes analisadores de massa, o que nos permite obter diferentes tipos de informação. Em termos de comparação podemos dizer que ambos os aparelhos têm um poder de resolução, uma precisão e sensibilidade elevadas. Enquanto que, o Ion Trap nos permite fazer espectrometria de massa tandem (MSn). Estes aparelhos podem ser utilizados como técnicas de análise complementares.

O Q-TOF combina dois tipos de analisadores, o quadrupolo e o TOF, que o torna significativamente mais sensível. Os quadrupolos são de relativo baixo custo, de fácil utilização e capazes de fornecer resultados rigorosos. No entanto a resolução é limitada e a transmissão diminui linearmente com o valor de  $m/z$ , sendo o limite superior de  $m/z$  cerca de 3000. Um quadrupolo é formado por quatro rolos paralelos aos quais se aplica uma corrente contínua que afecta o percurso dos iões viajando pelo trajecto centralizado entre os 4 rolos. Para as voltagens dadas, somente os iões de uma determinada relação  $m/z$  podem passar através do filtro do quadrupolo, enquanto os outros são varridos como moléculas descarregadas. Ao variar os sinais eléctricos de um quadrupolo, pode-se variar a faixa da relação  $m/z$  transmitida.

Um analisador de tempo de voo usa as diferenças de tempo que levam os iões gerados e acelerados para chegar ao detector. Os iões são acelerados por um pulso de campo eléctrico e as partículas aceleradas passam através de um tubo de voo de comprimento variável. O princípio essencial do analisador por tempo de voo baseia-se em que todos os iões são acelerados com a mesma energia. As suas velocidades são inversamente proporcionais às raízes quadradas de suas massas. Assim os iões mais leves de alta velocidade chegam ao detector antes do que os iões mais pesados de baixa velocidade.

A trapa linear de iões é um analisador que utiliza um campo eléctrico oscilatório para aprisionar os iões, que depois serão analisados. Quando dentro da trapa os iões voam ao longo do eixo dos  $zz$  entre os eléctrodos, enquanto que oscilam simultaneamente no plano  $xy$  devido a um RF- potencial. A aplicação de voltagem DC á parte final dos quadrupolos também permite que os iões sejam aprisionados. Esta voltagem repele os iões que se encontram dentro da trapa, esta repulsão é tanto maior quanto mais perto os iões se encontram dos extremos. Os iões são assim repelidos do centro do quadrupolo se for aplicada a cada extremo a mesma voltagem repelente.

O principal método de medição dos iões baseia-se na saída da trapa de iões por ordem crescente de razão massa/carga. (Edmond de Hoffmann 2007), (Milne, Ivanova et al. 2006)

### ***1.5.4 Espectrometria de massa tandem***

As principais características dos espectros de massa obtidos com o método de ionização suave são a ausência de fragmentação, o que permite a determinação rigorosa de massas moleculares de constituintes de misturas. No entanto, nestas condições pouca informação é obtida acerca da sua estrutura molecular. Para esse efeito é necessário proceder à fragmentação do ião desejado induzindo a dissociação dos iões formados na fonte, por colisão, normalmente através de um gás. Esta técnica é chamada de espectrometria de massa tandem ou MS/MS. Usando esta tecnologia, podemos retirar várias conclusões sobre a estrutura das moléculas analisadas e os espectros obtidos dão-nos não só as formas de quebra molecular mais frequente, como as mais favoráveis. A espectrometria de massa por MS/MS tem sido utilizada no estudo detalhado e na caracterização de várias moléculas, entre as quais aminoácidos e fosfolípidos

Esta técnica envolve geralmente 2 passos: inicialmente é utilizado um primeiro analisador para isolar o ião precursor, em seguida são analisados os iões produto. Esta técnica é identificada como MS/MS, no entanto pode-se aumentar o número de passos de modo a efectuar  $MS^n$  ( $n$  representa o numero de gerações de iões a ser analisados), (Hsu and Turk 2000; Pulfer and Murphy 2003; Kiyotaka Nakagawa 2005).

### ***1.6 Objectivos do trabalho***

Este trabalho tem por objectivo identificar o perfil lipídico das células dendríticas usando uma metodologia lipidómica e avaliar a modulação deste perfil após a maturação das DC induzida por lipopolissacarídeo (LPS). O perfil lipidómico das DCs será também avaliado após contacto destas células com alergénios e irritantes capazes de induzir a patologia dermatite de contacto.

Pretende-se identificar moléculas lipídicas que sejam moduladas durante a maturação das DCs que possam ser utilizadas e/ou manipuladas em estratégias imunoterapêuticas que utilizam estas células.



## **Capitulo 2**

### **Material e Métodos**

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Reagentes

#### **Modelo biológico utilizado: linha celular de células dendríticas da pele de feto de murganho (FSDC)**

##### Características gerais das FSDC

Como modelo de células dendríticas utilizamos uma linha celular de células dendríticas da pele de feto de murganho (FSDC). Esta linha celular foi obtida após infecção de uma suspensão de células da epiderme, isolada da pele de feto de murganho com dezassete dias de gestação, com um factor retroviral transportador do gene de fusão envAKR-mycMH2.

As células FSDC possuem uma morfologia dendrítica e apresentam um fenótipo de superfície consistente com um progenitor de células de Langerhans (LC) (MHCII+, MHCI+, CD11c+, CD11b+, CD54+, B7.2+, B220+, CD3+) (Girolomoni et al., 1995). Sendo um progenitor imaturo das LC, as FSDC necessitam de activação prévia com citocinas (GM-CSF, IL-4, IFN- $\gamma$ ) para estimularem a proliferação de linfócitos T virgens e para apresentarem alérgenos de contacto a linfócitos T sensibilizados, in vitro. In vivo, as FSDC são capazes de induzir uma resposta imunológica primária mediada por linfócitos T quando injectadas em murganhos. Em resumo, a linha celular FSDC possui as características fenotípicas e funcionais de um progenitor das LC (Girolomoni et al., 1995).

##### Condições de cultura das FSDC

As FSDC foram mantidas a 37°C, sob uma atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar, e diluídas 1:3 de 3 em 3 dias. As células foram cultivadas em meio de cultura de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), suplementado com soro fetal bovino a 10% (v/v), L-glutamina a 1% (m/v), penicilina (100 unidades/ml) e estreptomicina (100 µg/ml), e tamponizado com bicarbonato de sódio 36 mM e HEPES 25 mM, pH 7,4. O soro foi previamente submetido a 56°C, durante 30 minutos, com o objectivo de tornar inactivo o complemento e diminuir a citotoxicidade devida a imunoglobulinas.

## Material e Métodos

Para a realização das experiências, as células aderentes foram tratadas com uma solução de tripsina a 0,05% (m/v) e EDTA 0,02% (m/v) em tampão fosfato salino<sup>1</sup> (PBS), durante aproximadamente 3 minutos, e centrifugadas a 180 x g numa centrífuga Sorvall RT 6000 D, durante 5 minutos. O sedimento foi solubilizado em IMDM suplementado e procedeu-se de seguida à determinação da viabilidade e densidade celular. Para o efeito diluiu-se um pequeno volume de suspensão celular na proporção de 4:1 (v/v) com uma solução de azul de tripano a 0,4%, e aguardou-se 1 a 2 minutos. Após este período, necessário para o corante penetrar nas células com membrana fragilizada, colocou-se uma gota da suspensão celular na câmara dum hemocítmetro e procedeu-se à contagem, num microscópio óptico, do número de células coradas (células com a membrana citoplasmática danificada) e do número total de células nos quatro quadrantes. Calculou-se a percentagem de viabilidade celular, normalmente superior a 96%, bem como a densidade da suspensão inicial, tendo em atenção as diluições efectuadas e as características do hemocítmetro.

Por fim estas células foram expostas a LPS (lipopolissacarídeo), DNFB (2,4-dinitrofluorbenzeno) e SDS (dodecil sulfato de sódio).

### Cromatografia de camada fina

Para a cromatografia de camada fina utilizaram-se as placas de TLC silica gel 60 com zona de concentração 2.5x20cm, (Merck, Germany), e os reagentes: ácido bórico (DHB chemicals), etanol absoluto (Panreac), trietilamina (Acros organics), primulina (Sigma).

Os padrões de fosfolípidos (Fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, Fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, ceramida, esfingomielina) foram obtidos a partir da Avanti Lipids, USA.

Foram ainda utilizados os solventes metanol e clorofórmio para HPLC e água mili-Q purificada (Millipore, USA).

---

<sup>1</sup> Tampão fosfato salino (PBS): NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 9,1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, pH 7,4.

Após reconstituição com clorofórmio, as amostras foram submetidas a uma diluição com metanol para análise no modo negativo e metanol com ácido fórmico a 1% para análises no modo positivo, a algumas amostras foi ainda adicionado 2µL de Lítio, nos espectrómetros de massa.

## 2.2 Extração e separação de lipídios

### *Extracção*

A cultura foi inicialmente lavada com uma solução salina de tampão fosfato, e centrifugada 3 vezes, com 1 ml de PBS, a 200x g durante 4min. Os lípidos totais das células dendríticas foram extraídos pelo método de Bligh and Dyer (Bligh and Dyer 1959). Para cada mililitro de amostra, adicionou-se 3,75 ml de CHCl<sub>3</sub>: MeOH (1:2 v / v) e homogeneizou-se no vortex. Em seguida, adicionou-se 1,25 ml de CHCl<sub>3</sub> levou-se novamente ao vortex. Por último acrescentamos 1,25 ml de H<sub>2</sub>O e levamos ao vortex. Centrifugamos a 1000 rpm durante 5 minutos em temperatura ambiente para obter um sistema de duas fases: aquosa (superior) e orgânica (inferior). Recuperou-se a fase orgânica (fase inferior), ou seja o extracto lipídico. Finalmente, este extracto foi seco com a corrente de azoto e armazenado a -5°C para posteriores análises.

### *Separação das classes de lípidos por cromatografia de camada fina*

Os extractos lipídicos totais obtidos das células dendríticas imaturas, maduras e expostas a irritantes e alergénios, foram fraccionados em diferentes classes de lípidos utilizando a cromatografia de camada fina (TLC). Inicialmente, as placas de TLC sofreram uma lavagem prévia com metanol: clorofórmio, (1:1, v/v). Após estarem secas, foram borrifadas com uma solução de ácido bórico em etanol (2,3%, m/v) e colocadas na estufa a 100°C durante 15 minutos. As placas foram então deixadas a arrefecer na hotte para posterior aplicação dos extractos lipídicos.

Aplicou-se em cada spot 40 microlitros de solução dos fosfolípidos em clorofórmio, de uma solução com aproximadamente 300 µg de fosfolípido por ml. Para controlo aplicou-se um spot com uma mistura de padrões de fosfolípidos, que inclui fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomiéline, fosfatidilinositol, ceramidas, fosfatidilglicerol e fosfatidilserina.

A mistura de eluição utilizada foi clorofórmio/etanol/água/trietilamina (30:35:7:35, v/v/v/v). Após eluição completa, deixou-se a placa na hote até evaporação completa do eluentes. Para revelação dos fosfolípidos, borrifou-se a placa com uma solução de primulina (50µg/100 mL acetona:água, 80:20, v/v), e depois de seca identificaram-se os diferentes spots com a lâmpada de UV ( $\lambda=254$  nm).

Depois de identificados os spots para cada classe de fosfolípidos, estes spots foram raspados da placa, e as diferentes classes lipídicas (SM, PC, PS, PI, PE, PG e cer) extraídas da sílica com uma solução de clorofórmio: metanol, (1:1 v:v). Esta solução foi ainda lavada com água Mili-Q, de forma a retirar possíveis contaminantes.

A solução obtida para cada classe foi analisada por ESI-MS e ESI-MS/MS.

### 2.3 Instrumentação

Os extractos de cada classe de fosfolípidos foram analisados por espectrometria de massa utilizando ionização por electrospray, utilizando dois espectrómetros de massa distintos: um electrospray Q-TOF e um electrospray linear ion trap.

A aquisição de espectros de ESI-MS e MS/MS no instrumento Q-ToF 2 (Micromass, *Manchester, UK*) foi realizada no modo positivo utilizando um fluxo de entrada de 10 µl/min, a voltagem aplicada na agulha de 3kV com uma voltagem no cone de 30V. A temperatura na fonte de 80°C e a de solvatação 150°C. No modo negativo o mesmo instrumento foi utilizado apenas alterando a voltagem aplicada na agulha de -2,6kV. Os espectros *tandem* foram realizados nos iões de interesse usando árgon como gás de colisão. A energia de colisão utilizada variou entre 20-35 V de acordo com o ião precursor a analisar. Para o tratamento de resultados foi utilizado o programa de *software* MassLynx (versão 4.0).

O espectrómetro de massa trapa de iões linear LXQ (*ThermoFinnigan, Palo Alto, USA*) foi utilizado em modo positivo, com as seguintes condições de *electrospray*: voltagem do *electrospray* de 5 kV; temperatura do capilar de 275°C, o fluxo do gás de 25 unidades. No modo negativo foram utilizadas as mesmas condições alterando apenas: a voltagem do electrospray de 4,7kV, e a temperatura do capilar de 275°C. Foram realizados espectros de MS2 nos iões de interesse, variando a energia de colisão entre 18-30 de unidades arbitrárias. Para o tratamento de resultados foi utilizado o programa de *software* Xcalibur (V2.0).

## **Capítulo 3**

### **Avaliação do Perfil Lipídico de Células Dendríticas imaturas e maduras por espectrometria de massa**

### **3 Avaliação do Perfil Lipídico de Células dendríticas imaturas e maduras por espectrometria de massa**

#### **3.1 Introdução**

As células dendríticas, DCs, após formação a partir das células progenitoras hematopoiéticas, designadas como DCs imaturas, circulam na corrente sanguínea até aos tecidos periféricos e apresentam características morfológicas próprias. Algumas destas características são modificadas após o contacto com alérgenos, conduzindo à sua diferenciação em DCs maduras. Neste processo de maturação, as DCs sofrem alterações fenotípicas e funcionais, tal como referido no capítulo anterior. Sabe-se que estas alterações são acompanhadas de diferenças a nível proteico (Gundacker, Haudek et al. 2009), contudo não foram ainda avaliadas as alterações no perfil lipídico, nestes dois estados de diferenciação distintos.

Os lipopolissacarídeos (LPS) são uns dos compostos que induzem a maturação das DCs. O LPS bacteriano é o principal constituinte da parede celular das bactérias Gram-negativas. Estes potentes activadores do sistema imunológico, são formados por uma molécula de açúcar (polissacarídeo) que está covalentemente ligado a um lípido, denominado lípido A. Ainda que isolado este lípido A é responsável pela interacção com as células do sistema imunitário e capaz de causar a activação das células, sendo por isso referido como o princípio endotóxico do LPS. (Bluml, Kirchberger et al. 2005) (Gundacker, Haudek et al. 2009) (Mueller, Brandenburg et al. 2005) (Mackman 2003)

Neste capítulo será caracterizado o perfil lipídico de DC quando imaturas e após maturação, utilizando a espectrometria de massa, (MS) com ionização por electrospray, utilizando uma metodologia lipidómica (Wenk 2005; Wolf and Quinn 2008). Enquadrado nesta metodologia utilizamos duas estratégias complementares de análise: inicialmente realizou-se a análise do extracto total de lípidos de cada tipo de células por MS e, posteriormente, procedeu-se a uma separação inicial de cada classe de lípidos por TLC, e análise de cada classe de lípidos por MS.

A identificação e caracterização de lípidos neutros e fosfolípidos foi realizada utilizando MS com ionização por electrospray (ESI-MS) quer no modo positivo quer no modo negativo. A identificação de cada fosfolípido foi feita baseada na identificação do seu peso molecular (por análise de espectros de ESI-MS) e na análise da fragmentação

característica observada em ESI-MS/MS, que permite identificar inequivocamente a classe de cada fosfolípido, bem como a sua composição em ácidos gordos.

O fraccionamento prévio por cromatografia permite detectar iões de espécies que estejam sobrepostas nos espectros totais, por os seus iões apresentarem valores de  $m/z$  iguais aos de outros, e permite ainda detectar lípidos que possam estar em menor quantidade nos extractos totais e que os seus iões possam estar confundidos com o sinal ruído.

### ***3.2 Análise do extracto lipídico total por ESI-MS e ESI-MS/MS directa***

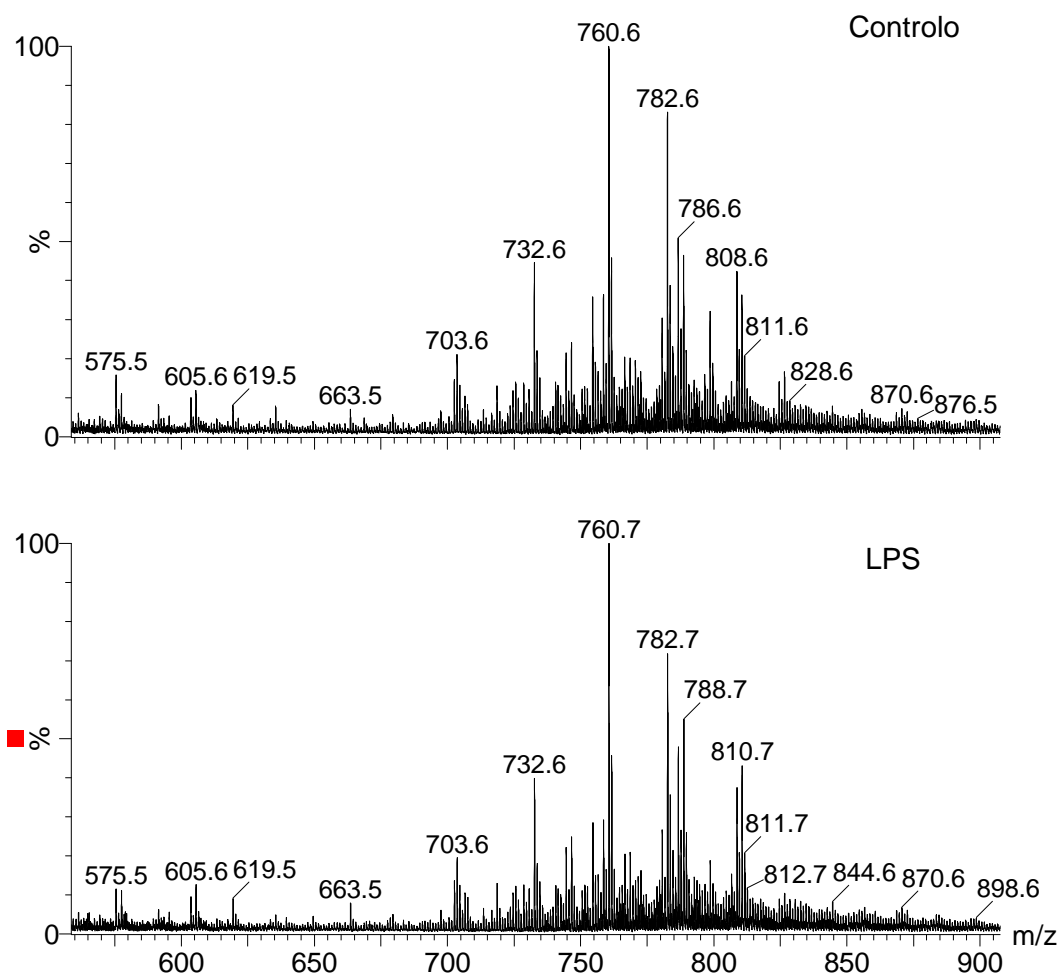
Iniciamos o estudo do perfil lipídico das células dendríticas através da obtenção dos espectros de ESI-MS dos lípidos totais no modo positivo e negativo, que apresentamos em seguida.

A análise do extracto total foi realizada dado que em alguns trabalhos foram observadas alterações do perfil lipídico em extractos totais, como por exemplo no artigo de revisão apresentado por Han and Gross (Han and Gross 2005).

#### ***Análise dos espectros de ESI-MS no modo positivo***

Os espectros de ESI-MS dos lípidos totais foram obtidos no modo positivo quer para as DCs imaturas quer para as DCs maduras, para vários extractos, e em vários dias, tendo-se obtido resultados reprodutíveis e concordantes. Apresenta-se na Figura 9 os espectros de ESI-MS representativos de cada um dos estados de maturação destas células.





**Figura 9: Espectros de ESI-MS no modo positivo do extracto lipídico total obtido de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (após exposição a LPS)**

Os espectros de massa obtidos por ESI-MS no modo positivo revelam a presença de vários iões de maior abundância relativa correspondendo aos fosfolípidos protonados  $[M+H]^+$  e aos seus aductos de sódio  $[M+Na]^+$ . Na análise de fosfolípidos por ESI-MS é frequente a observação destes na forma de aductos de sódio,  $[M+Na]^+$ , mesmo sem a adição de sódio. Os fosfolípidos que ionizam formando iões positivos com maior abundância relativa são as fosfatidilcolinas (PC), as fosfatidiletanolaminas (PE) e as esfingomielinas (SM). Os espectros de ESI-MS obtidos foram analisados de modo a identificar os fosfolípidos mais abundantes nestes extractos.

De acordo com o esperado encontramos como iões mais abundantes (Figura 8) os iões de  $m/z$  760 correspondente ao ião  $[M+H]^+$  de uma PC 16:0/18:1 e o ião de  $m/z$  782 corresponde ao aducto de sódio  $[M+Na]^+$  da mesma PC.

Após análise destes espectros identificámos ainda outras fosfatidilcolinas, tais como a PC 16:0/16:1 ( $m/z$  732 correspondente ao ião  $[MH]^+$  e  $m/z$  754 correspondente ao ião  $[MNa]^+$ ), PC 18:0/18:1 ( $m/z$  788  $[MH]^+$  e  $m/z$  810  $[MNa]^+$ ), PC 18:1/18:1 ( $m/z$  786  $[MH]^+$  e  $m/z$  808  $[MNa]^+$ ). Identificámos contudo que o ião de  $m/z$  810 pode corresponder também ao ião  $[MH]^+$  da PC 20:4/18:0.

Foram ainda identificados alguns iões atribuídos a fosfatidiletanolaminas, entre os quais os mais abundantes foram os iões  $[M+Na]^+$  de  $m/z$  786 e  $m/z$  788, e identificados respectivamente como PE 18:1/20:5 e PE 18:1/20:4. Os correspondentes iões  $[M+H]^+$  de  $m/z$  764 e  $m/z$  766, respectivamente são também observados nos espectros de ESI-MS, embora apresentem uma abundância relativa menor.

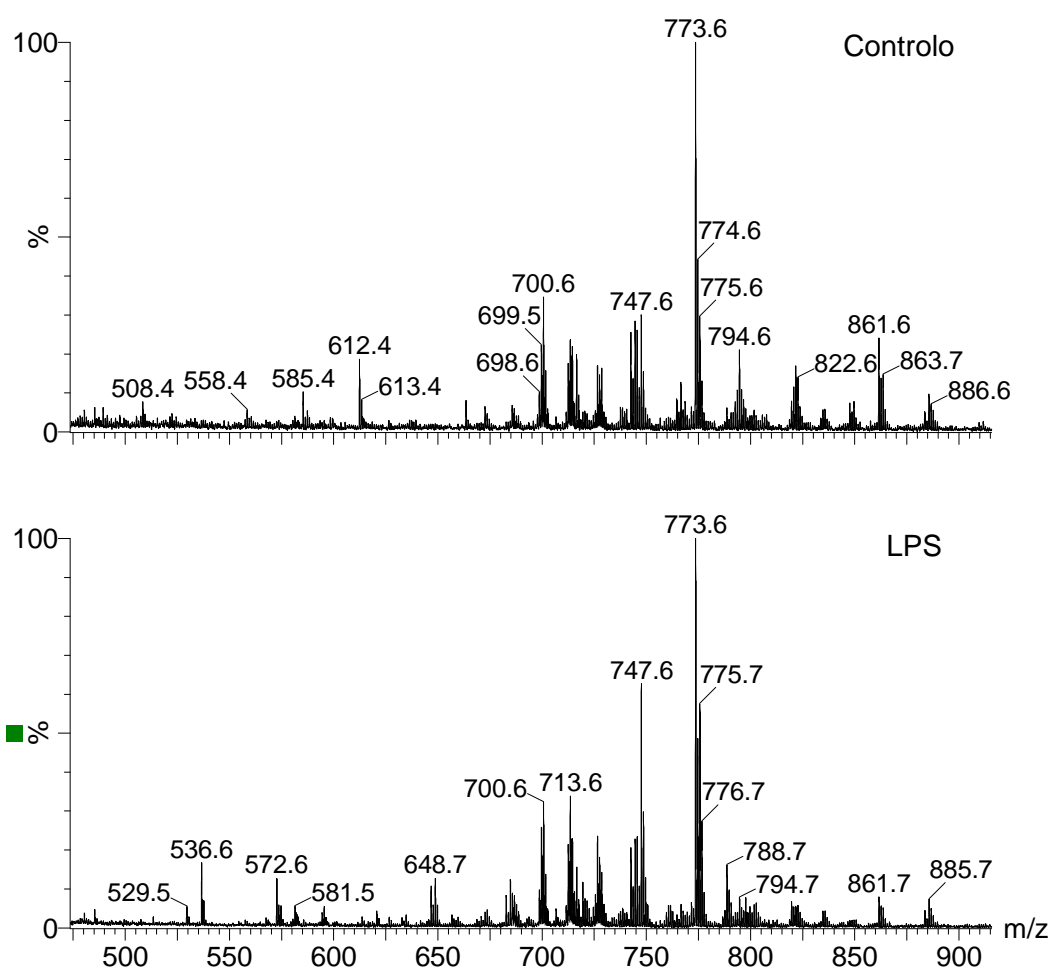
As esfingomielinas, que pela sua fórmula molecular, apresentam um número de azotos par, o que se traduz num valor de peso molecular também par, correspondem à formação de iões com valor ímpar, logo fáceis de diferenciar em comparação quer com as PC quer com as PE. De acordo com o espectro anteriormente, os fosfolípidos das classes de PC e PE ionizam com formação de iões de  $m/z$  de valor par. Entre estas SM identificámos a SM d18:1/16:0 SM, através do ião  $[MH]^+$  de  $m/z$  703, como o esfingolípido mais abundante destas células.

No entanto, não foi possível encontrar diferenças significativas, na comparação dos espectros de ESI-MS no modo positivo dos lípidos totais extraídos das DCs imaturas e maduras.

A análise mais detalhada de cada componente destas classes de fosfolípidos de PC, PE e SM, nomeadamente apresentando os dados obtidos por interpretação de vias de fragmentação observadas em ESI-MS/MS, será descrita em detalhe após a análise das diferentes classes separadas previamente em cromatografia de camada fina.

### **Análise dos espectros de ESI-MS no modo negativo**

Em analogia com o procedimento de análise por espectrometria de massa no modo positivo, também foram obtidos espectros dos lípidos totais, no modo negativo, ou seja, para detectar iões negativos, quer para as DCs imaturas quer para as DCs maduras. De modo a validar os resultados obtidos, os espectros foram adquiridos para vários extractos celulares, e em vários dias, tendo-se obtido resultados reprodutíveis e concordantes. Apresenta-se na Figura 10 os espectros de ESI-MS obtidos nestes ensaios.



**Figura 10: Espectro de ESI-MS de fosfolípidos totais extraídos de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS) no modo negativo**

Os fosfolípidos das classes das fosfatidilserina PS, fosfatidilglicerol PG e fosfatidilinositol PI ionizam preferencialmente no modo negativo, formando iões  $[M-H]^-$  observáveis nos espectros de ESI-MS (-) com boa abundância relativa. No espectro de ESI-MS dos lípidos totais obtido no modo negativo (Figura 10) observamos a presença de

iões  $[M-H]^-$  correspondentes aos fosfolípidos mais abundantes destas mesmas classes. É ainda de referir que se consegue observar nestes espectros de ESI-MS (-) iões correspondentes a lípidos pertencentes à classe das ceramidas, com valores de  $m/z$  inferiores a 700, mas curiosamente apenas identificados no espectro de ESI-MS (-) de lípidos totais extraídos de DCs maduras (LPS). Este facto este que será discutido mais em detalhe e ao longo deste capítulo.

Assim, analisando os espectros de ESI-MS (-) obtidos para os espectros totais de iDC e mDC, apresentados nas Figura 9, observam-se vários iões comuns. O ião de maior abundância relativa, de  $m/z$  773, foi identificado como um fosfolípido da classe de fosfatidilglicerol, com dois ácidos oleicos (C18:1), PG 18:1/18:1. Após análise mais detalhada dos espectros, identificámos ainda dentro desta mesma classe, outros fosfolípidos, entre os quais os iões a  $m/z$  747 (PG 18:1/16:0) e  $m/z$  769 (PG 18:1/18:3).

Foram ainda identificados diversos iões  $[M-H]^-$  atribuídos a fosfolípidos da classe dos fosfatidilinositóis, em que os mais abundantes apresentam valores de  $m/z$  861 e  $m/z$  885, correspondentes à PI 18:1/18:1 e à PI 18:0/20:4, respectivamente.

As fosfatidilserinas surgem nestes espectros, com iões de menor abundância relativa, embora se deva salientar que uma menor ou maior abundância relativa dos iões nos espectros de ESI-MS não reflectam directamente a sua proporção no extracto total, mas sejam também dependentes das propriedades químicas que condicionam a capacidade e ionização de cada grupo químico ligada à cabeça do fosfolípido. O ião com maior abundância relativa atribuído a essa classe de PS, foi observado a  $m/z$  788 que corresponde à PS 18:1/18:0, embora também tenham sido identificados outros iões, como mais á frente se discutirá em detalhe.

Ao contrário do observado na análise do extracto total no modo positivo, a análise no modo negativo permitiu observar algumas diferenças nos espectros obtidos para as DCs imaturas e maduras. No espectro dos lípidos totais no modo negativo das DCs maduras, identificámos alguns iões atribuídos a lípidos da classe das ceramidas, entre os quais os mais abundantes correspondem aos iões  $[M-H]^-$  de  $m/z$  536 e 648 que correspondem às ceramidas d18:1/16:0 e d18:1/24:0, respectivamente. Estes iões não são observáveis no espectro das iDC.

A análise do perfil lípido de células dendríticas permitiu identificar diferenças no perfil lípido total entre células dendríticas imaturas e maduras, em que a maturação foi induzida pelo LPS. Estas diferenças foram obtidas aquando análise do extracto lipídico total apenas no modo negativo, permitindo identificar o aumento de ceramidas nos extractos

de células dendríticas maduras, Este poderá ser um marcador importante envolvido na maturação destas células e que poderá funcionar como sinalizador celular.

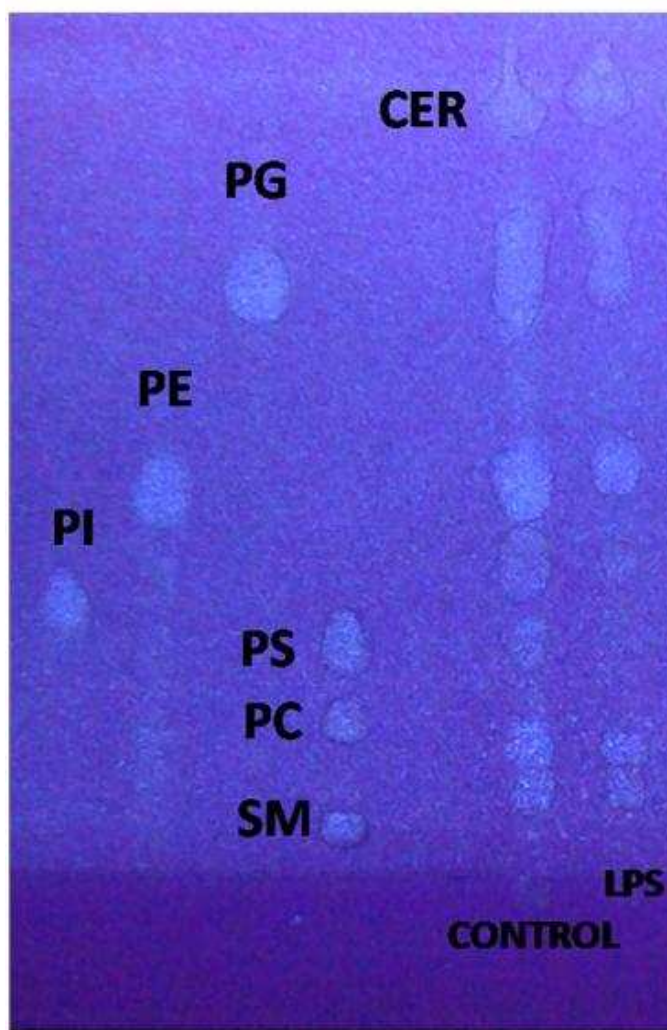
Assim, após termos observado alterações do perfil lipídico das DCs quando maduras, através do espectro de ESI-MS do extracto de lípidos totais no modo negativo, prosseguimos para uma análise mais detalhada do perfil lipídico, iniciada por uma separação das classes por cromatografia de camada fina e posterior análise por Espectrometria de Massa.

### ***3.3 Análise das diferentes classes de lípidos por TLC, ESI-MS e ESI-MS/MS***

Após a aquisição dos espectros de MS do fosfolípidos totais e já na posse de muita informação, prosseguimos para a separação das classes lipídicas por cromatografia de camada fina.

Esta técnica baseia-se na diferente afinidade dos componentes de uma mistura entre o eluente e a fase estacionária depositada sobre uma superfície plana. Os fosfolípidos migram uma certa distância na fase estacionária, segundo a sua composição e a afinidade com a fase móvel. A fase móvel consiste num sistema de solventes que pode variar em termos de polaridade, de acordo com as classes de lípidos pretendidas. No entanto, e considerando que a fase estacionária é polar, a ordem da eluição dos fosfolípidos está baseada no princípio dos fosfolípidos apolares terem mais afinidade pela fase móvel e serem eluídos primeiro, ou seja apresentando maior  $R_f$ , enquanto os fosfolípidos polares têm mais afinidade pela fase estacionária e são eluídos mais lentamente, apresentando tanto menor  $R_f$  quanto maior a sua polaridade. Neste trabalho foi utilizado um sistema de solventes composto por clorofórmio, metanol, água e trietilamina, sistema este descrito na literatura para a separação das diferentes classes de lípidos, como a seguir se demonstra (Fuchs, Schiller et al. 2007).

Tal como podemos ver na Figura 11, a cromatografia de placa fina permitiu separar 7 classes de lípidos (SM, PC, PS, PI, PE, PG e ceramidas). A posição de cada classe foi verificada através da eluição de padrões dessas mesmas classes.



**Figura 11: Cromatografia de camada fina (TLC) e revelação com primulina.**

**Podemos visualizar padrões das diferentes classes (SM, PC, PS, PI, PE, PG e ceramidas) e separação das classes lipídicas das DCs imaturas (control) e maduras (LPS).**

Após separação das classes de lípidos por TLC, e extracção destas da sílica, as diferentes classes foram analisadas por ESI-MS. Assim obtiveram-se espectros de ES-MS cada classe individualmente, para as DCs imaturas e DCs maduras, podendo assim comparar e verificar possíveis alterações no perfil de cada classe mais detalhadamente.

Foram analisadas em detalhe a composição das seguintes classes: SM, PC, PS, PI, PE, PG e ceramidas. Por não termos feito uma aplicação de quantidades iguais de fosfolípido total, não podemos fazer uma apreciação quantitativa, mas apenas qualitativa.

Após identificação dos iões nos espectros de ESI-MS, foi realizada a análise de cada ião por ESI- MS/MS dos iões, de forma a confirmar de forma inequívoca a sua classe e identificar cada uma das espécies observadas.

### ***Análise dos espectros de ESI-MS e ESI-MS/MS no modo positivo***

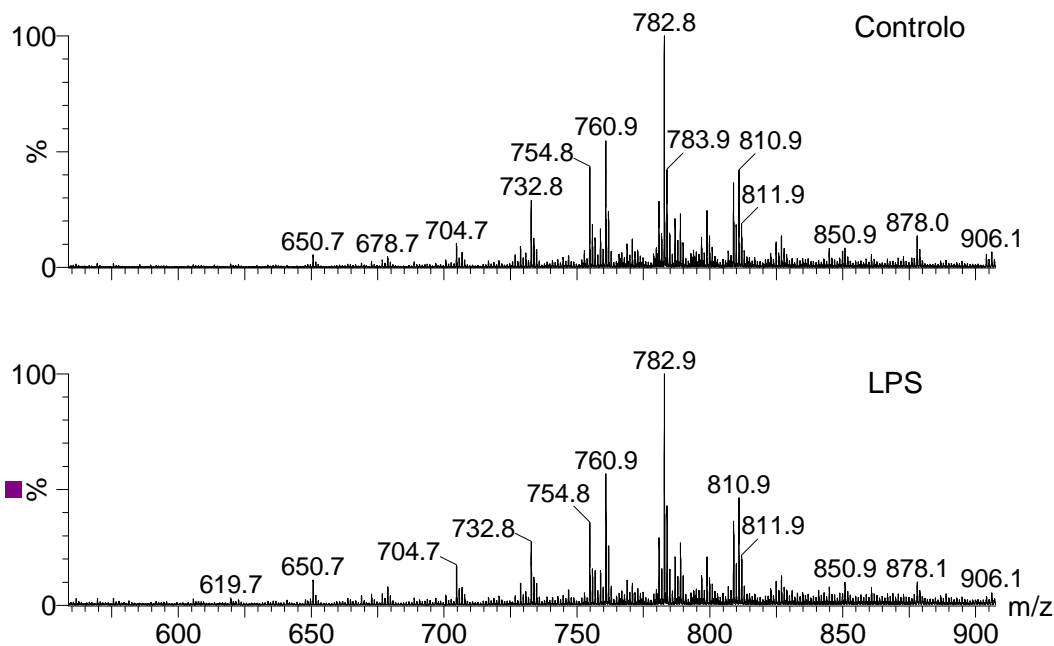
Já na posse das classes lipídicas separadas, iniciámos a análise por ESI-MS e ESI-MS-MS. No modo positivo, analisámos as classes lipídicas das fosfatidilcolinas, das fosfatidiletanolaminas e das esfingomielinas. Em seguida apresentamos e discutiremos, separadamente os espectros de cada uma destas classes separadas por TLC de DCs imaturas e maduras, de forma a observar possíveis alterações no perfil lipídico. Os resultados serão resumidos em tabelas com as espécies identificadas em cada classe.

Os fosfolípidos destas classes podem ionizar formando iões  $[M+H]^+$  e/ou  $[M+Na]^+$ , dependendo das condições experimentais. Os espectros de ESI-MS/MS de  $[M+H]^+$  por vezes fornecem pouca informação estrutural, indicando apenas a classe a que pertence a espécie em análise. Esta desvantagem é contudo ultrapassada pela análise das vias de fragmentação de iões sodiados  $[M+Na]^+$ , pelo que estes também serão descritos neste capítulo.

#### **3.3.1 Fosfatidilcolinas**

As fosfatidilcolinas são geralmente uma das classes lipídicas mais abundantes nas células, encontrando-se predominantemente nas membranas celulares. A classe das fosfatidilcolinas consiste nos compostos 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolina; 1-O-alkil-2-acil-sn-glicero-3-fosfocolina; 1-O-alk-1-enil-2-acil-snglicero-3-fosfocolina. Na maioria dos tecidos, a subclasse predominante de fosfatidilcolina é 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolina (Billah and Anthes 1990).

Algumas espécies desta classe foram já identificadas através do espectro de lípidos totais. Na Figura 12 apresentamos a comparação dos espectros de DCs imaturas e maduras referente à classe das fosfatidilcolinas.



**Figura 12: Espectros de ESI-MS de fosfatidilcolinas separados por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS) no modo positivo**

Apesar de ser uma das classe mais abundantes e termos conseguido muita informação a partir do espectro de lípidos totais, o espectro após a separação por TLC nas colinas traz-nos ainda muita informação adicional. Nestes espectros podemos observar iões  $[MH]^+$  e  $[MNa]^+$  destes fosfolípidos. Nestes espectros conseguimos identificar diacilfosfatidilcolinas (1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolina) e também alquilacilfosfatidilcolinas (1-O-alkil-2-acil-sn-glicero-3-fosfocolina) (Hsu and Turk 2007), (Taguchi, Hayakawa et al. 2000).

É ainda de referir não termos nenhuma alteração significativa no perfil de fosfatidilcolinas entre DCs imaturas e maduras.



Na Tabela 1 apresentamos os valores de  $m/z$ , o tipo de ião  $[MH]^+$  ou  $[MNa]^+$ , e as fosfatidilcolinas correspondentes identificadas nos extractos de DCs, e ainda a que sub-classe das fosfatidilcolinas pertencem os iões. (Reis, Domingues et al. 2004) (Domingues, Domingues et al. 2001)

**Tabela 1: Fosfatidilcolinas pertencentes às DCs identificadas no modo positivo**

Diacil				Alquilacil			
$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	C:N	Espécies moleculares	$[M+H]^+$	C:N	$[M+Na]^+$	Espécies moleculares
496			LPC16:0				
				504		526	LPC O-16:0
522	544		LPC18:1				
566		20:0	10:0/10:0				
622		24:0	14:0/10:0				
				636	26:0	648	O-16:0/10:0
650		26:0	16:0/10:0				
676		28:1	12:0/16:1				
678		28:0	14:0/14:0				
704	726	30:1	14:0/16:0				
706		30:0	14:0/16:0				
732	754	32:1	16:0/16:1				
734		32:0	16:0/16:0				
				746	34:1		O-16:0/18:1
				748	34:0		O-16:0/18:0
756		34:3	16:1/18:2				
758	780	34:2	16:1/18:1				
760	782	34:1	18:1/16:0				
				772	36:2		O-16:0/20:2
778	800	36:6	16:2/20:4				
784	806	36:3	18:1/18:2				
786		36:2	18:1/18:1				
788	810	36:1	18:0/18:1				
808		38:5	20:4/18:1				
810		38:4	20:4/18:0				
812		38:3	20:1/18:2				
814		38:2	20:1/18:1				
816		38:1	22:0/16:1				

Todas estas fosfatidilcolinas foram identificadas pela análise dos seus espectros de ESI-MS/MS. Alguns destes fosfolípidos aparecem no espectros de ESI-MS na forma de iões  $[MH]^+$  e também de  $[MNa]^+$ . Nestes casos foram obtidos os espectros de MS/MS para ambos os iões do mesmo fosfolípido, pois fornecem informação complementar. (Reis, Domingues et al. 2004), (Reis, Domingues et al. 2005), (Ramanadham, Hsu et al. 1999), (Fuchs, Schiller et al. 2005).

Apresentaremos de seguida, os espectros de MS/MS dos iões  $[M+H]^+$  da acilPC 18:1/16:0 de  $m/z$  760 e do ião  $[M+Na]^+$  de  $m/z$  782 do mesmo fosfolípido (Figura 13), ilustrativo das vias de fragmentação típicas observadas em MS/MS para este tipo de fosfolípido.

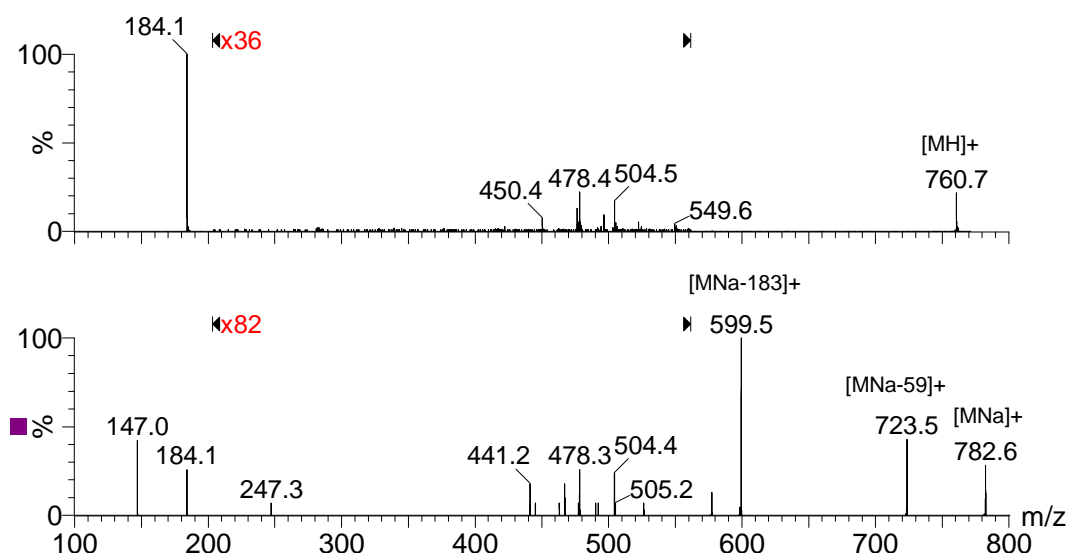
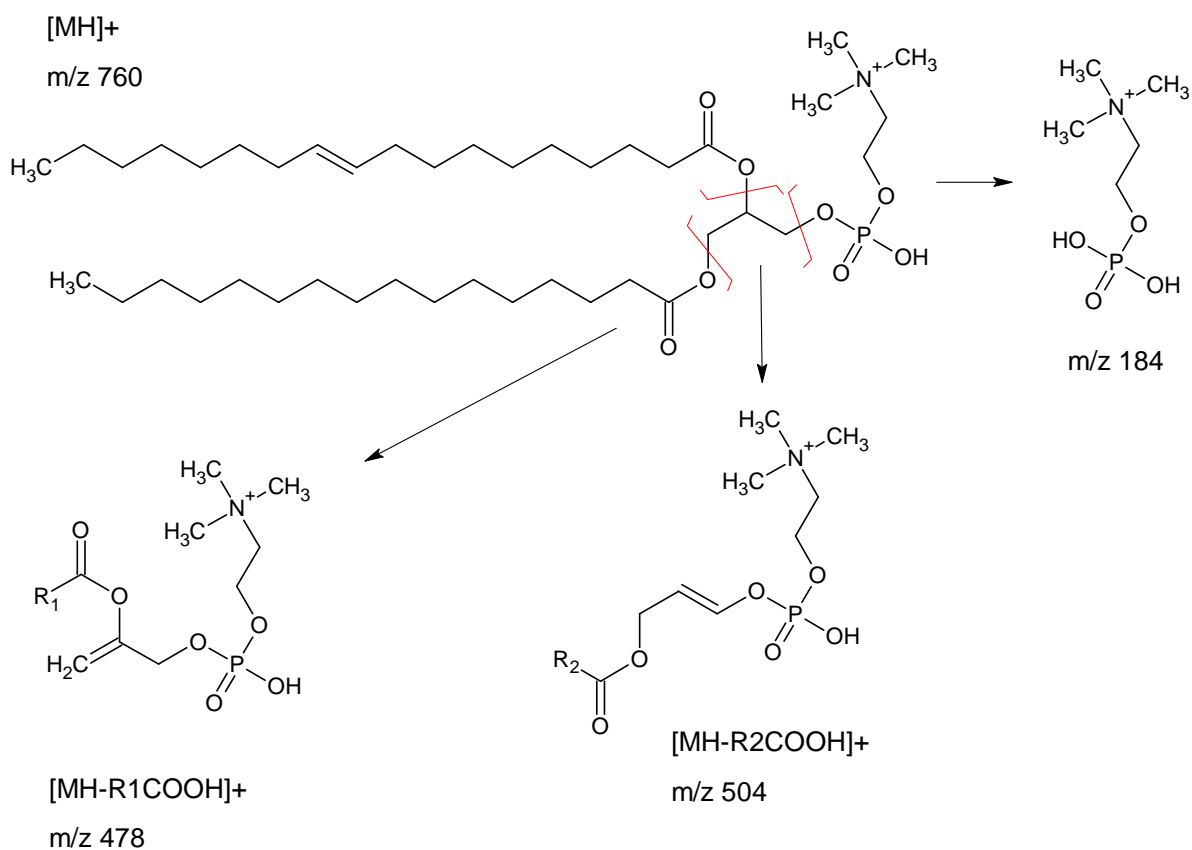


Figura 13: Espectros de ESI-MS/MS da PC 18:1/16:0

A) do  $[MH]^+$  de  $m/z$  760 e ) do ião  $[MNa]^+$  de  $m/z$  782.

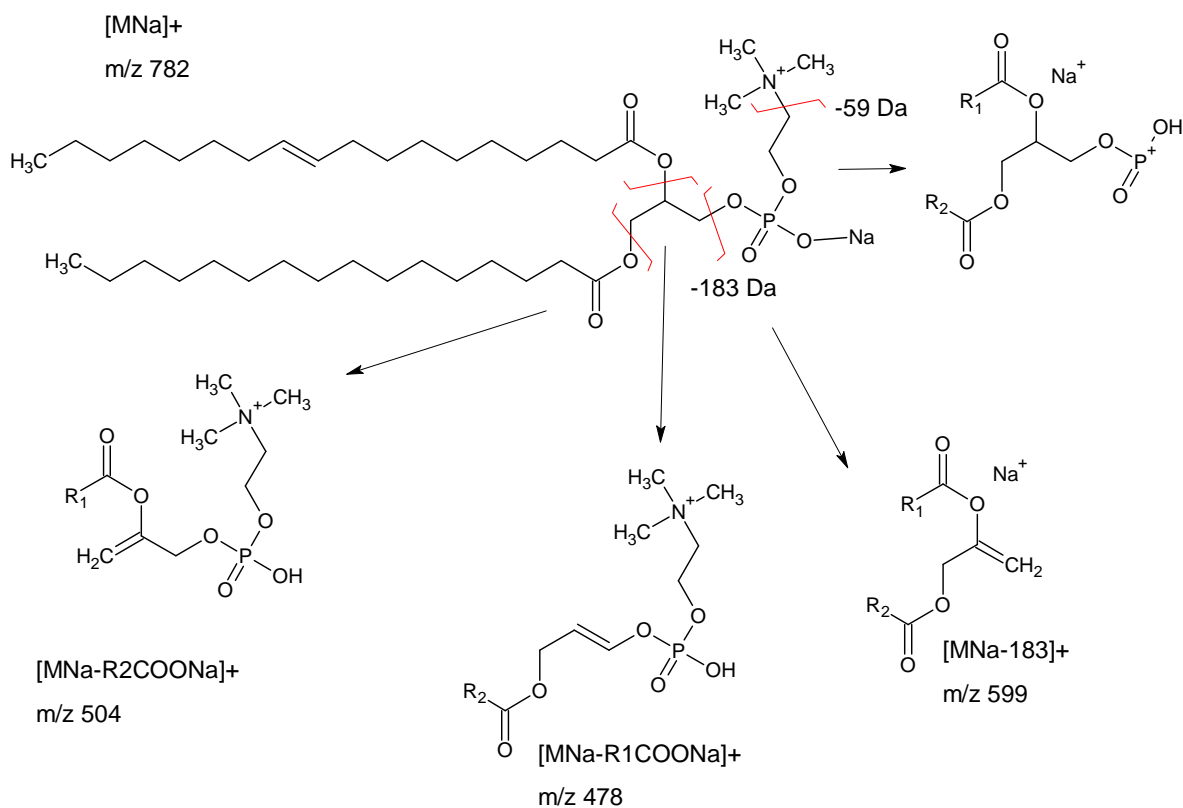
O espectro de ESI-MS/MS do ião  $[MH]^+$  de uma fosfatidilcolina apresenta um ião de  $m/z$  184, correspondente á quebra entre o grupo fosfato e a o grupo colina da cabeça, tal como representado na Figura 14. Os outros iões fragmento apresentam baixa abundância relativa, embora sejam informativos por indicarem o tipo de ácidos gordos presentes na molécula. Estes iões forma-se por perdas dos ácidos gordos, ou seja perda de  $RCOOH$ , com formação do iões  $[MH-R_1COOH]^+$  de  $m/z$  478 e iões  $[MH-R_2COOH]^+$  de  $m/z$  504.

Na Figura 13 b, mostra o espectro de MS/MS do ião  $[MNa]^+$ , de  $m/z$  782, da mesma fosfatidilcolina, PC16:0/18:1. Por comparação com a Figura 13 a, pode-se constatar que o aspecto do espectro do ião  $[MNa]^+$  é distinto do ião  $[MH]^+$ . De facto o espectro do aducto de sódio apresenta mais iões fragmento, mas não apresenta o ião de  $m/z$  184. No podem observar-se neste espectro outros iões fragmento característicos tais como o ião  $[MNa-59]^+$  ( $m/z$  723),  $[M+Na-183]$  ( $m/z$  599) e  $[MNa-205]$  ( $m/z$  577), que se encontram representados na Figura 15. Observamos ainda a perda dos ácidos gordos na forma de  $[MNa-RCOONa]^+$ , de  $m/z$  478 e 504, respectivamente para a perda de  $R_1COONa$  e  $R_2COONa$ .



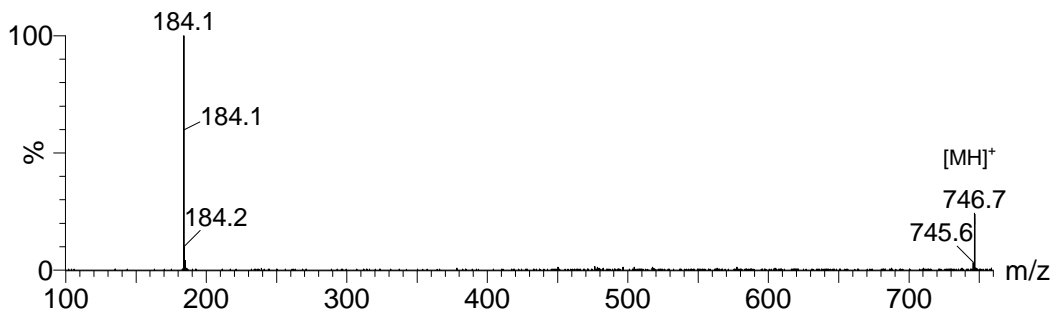
**Figura 14: Estrutura da fosfatidilcolina PC 18:1/16:0 e fragmentação característica da classe das PC  $[MH]^+$  no modo positivo**

## Avaliação do Perfil Lipídico de Células dendríticas imaturas e maduras por espectrometria de massa

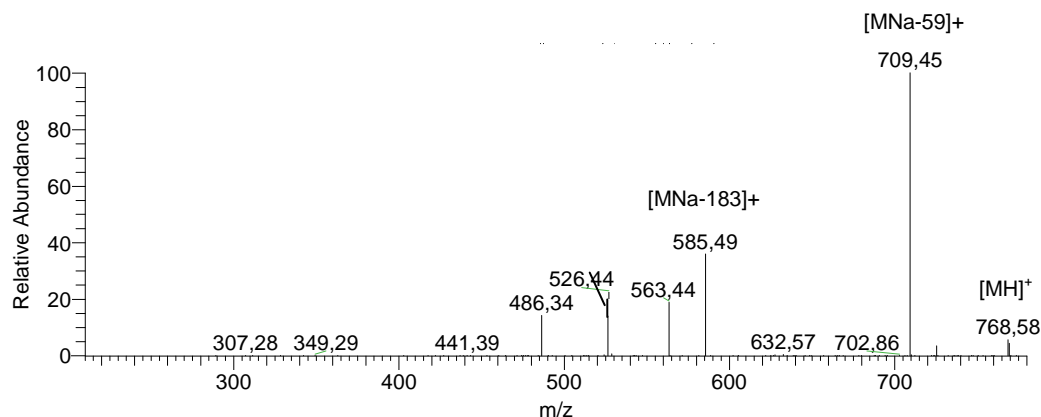


**Figura 15: Estrutura da fosfatidilcolina PC 18:1/16:0 e fragmentação característica da classe das PC [MNa]<sup>+</sup> no modo positivo**

Serão também descritas as vias de fragmentação observadas para os alquilacilPC, exemplificados para os iões [MH]<sup>+</sup> de *m/z* 746 e [MNa]<sup>+</sup> de *m/z* 768 com a identificação dos iões produtos observados (Hsu and Turk 2007).



**Figura 16: Espectros de ESI-MS/MS da PC O-16:0/18:1 [MH]<sup>+</sup> de *m/z* 746.**

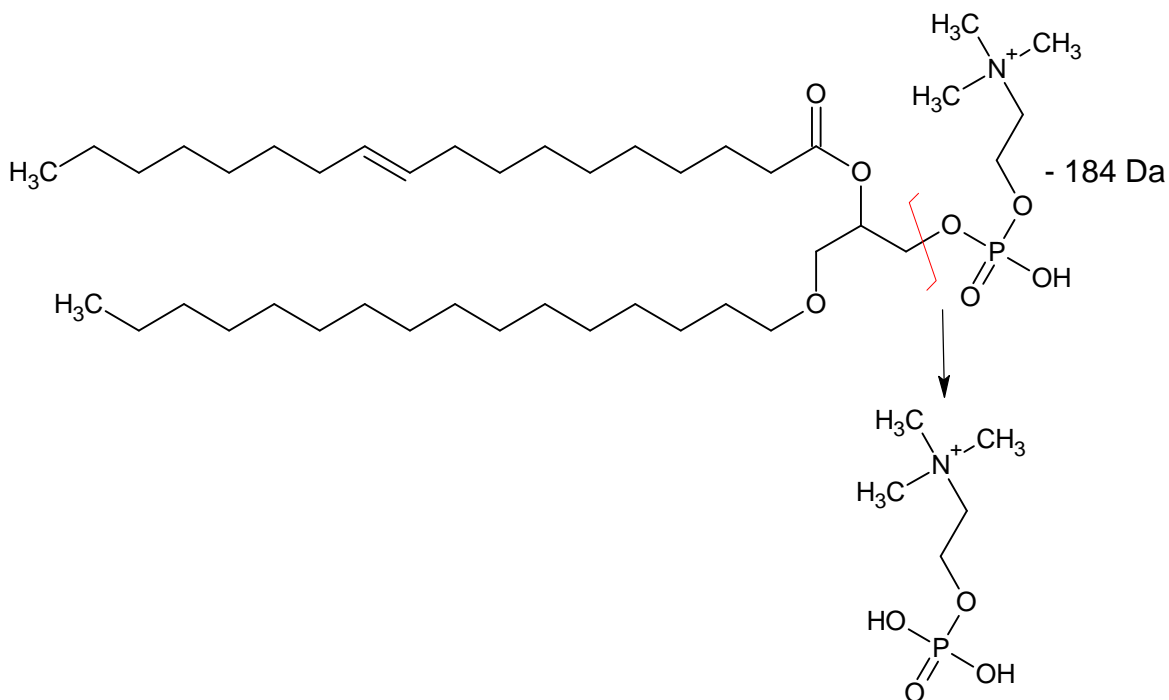


**Figura 17: Espectros de ESI-MS/MS de [MNa]<sup>+</sup> de PC O-16:0/18:1 de m/z 768.**

:

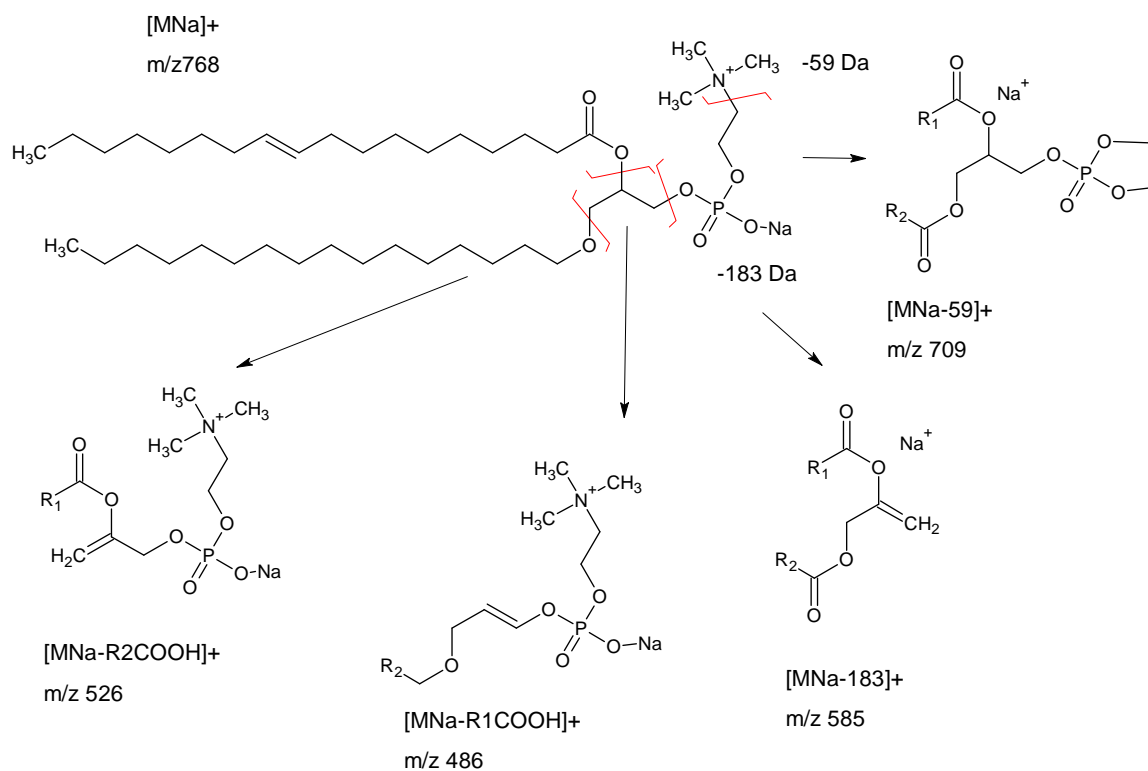
Na Figura 16 observamos espectro de ESI-MS/MS do ião [MH]<sup>+</sup> PC O-16:0/18:1, de m/z 746, que mostrar apenas o ião de m/z 184 correspondente á cabeça da colina (Figura 18), à semelhança do que se observou para a s diacilfosfatidilcolinas.

Na Figura 17, mostramos o espectro do ião [MNa]<sup>+</sup> da mesma alquilacilPC (PC O-16:0/18:1), a m/z 768, que apresenta as perdas características das colinas sodiadas, com formação dos iões: [MNa-59]<sup>+</sup> (m/z 709), [MNa-183]<sup>+</sup> (585m/z) e [MNa-205]<sup>+</sup> (563m/z), que se encontram esquematizados na Figura 19. Observamos ainda a perda dos ácidos gordos na forma de [MNa-RCOONa]<sup>+</sup> (m/z 526 e 486).



**Figura 18: Estrutura da alquilacilfosfatidilcolina PC O-16:0/18:1 e fragmentação característica da classe das PC [MH]<sup>+</sup> no modo positivo.**

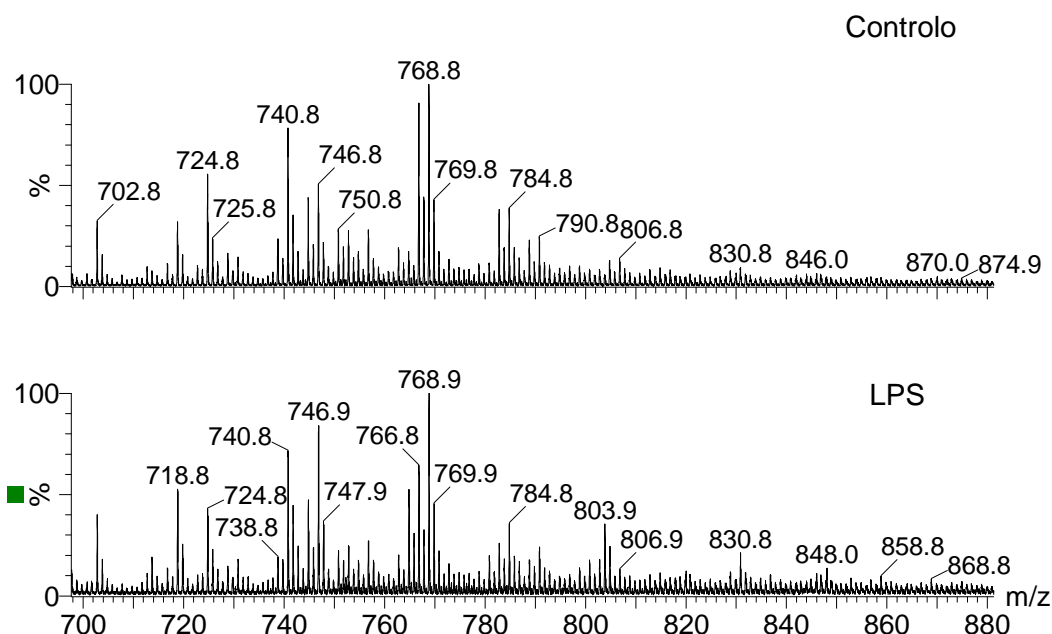
Avaliação do Perfil Lipídico de Células dendríticas imaturas e maduras por espectrometria de massa



**Figura 19:** Estrutura da alquilacilfosfatidilcolina PC O-16:0/18:1 e fragmentação característica da classe das PC  $[MNa]^+$  no modo positivo.

### 3.3.2 Fosfatidiletanolaminas

A classe das etanolaminas é também uma das mais abundantes nos tecidos vivos. No entanto, a informação conseguida a partir do espectro de ESI-MS de lípidos totais para os componentes desta classe é limitada, pois os seus iões são mascarados pelos iões das fosfatidilcolinas que apresentam sempre uma abundância relativa superior. Assim o espectro após a separação por TLC das PE traz-nos bastante informação adicional.



**Figura 20: Espectro de ESI-MS de fosfatidietanolaminas separados por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS) no modo positivo**

Na figura 20 apresentamos os espectros obtidos para as classes de fosfatidiletanolaminas, para as células dendríticas imaturas e maduras.

A maioria dos iões aqui identificados não foram observados nos espectros obtidos para os extractos totais, nem mesmo os iões mais abundantes, tais como os de  $m/z$  746 e 768, que correspondem respectivamente aos iões  $[MH]^+$  da PE 18:0/18:1 e da PE 18:0/20:4.

Tal como a classe das fosfatidilcolinas, também a classe das fosfatidiletanolaminas consiste nos compostos 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina; 1-O-alkil-2-acil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina e 1-O-alk-1-enil-2-acil-snglicero-3-fosfoetanolamina. No entanto verifica-se que na maioria dos tecidos, a subclasse

predominante é a 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (Billah and Anthes 1990) (Hsu and Turk 2007) (Taguchi, Hayakawa et al. 2000).

Nestes espectros conseguimos identificar diacilfosfatidiletanolaminas (1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina) e também alquilacilfosfatidiletanolaminas (1-O-alkil-2-acil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), como se apresenta na Tabela 2.

Na tabela seguinte apresentamos os valores de  $m/z$ , o tipo de ião  $[M+H]^+$  ou  $[M+Na]^+$  e as etanolaminas correspondentes, identificadas nos extractos de DCs e ainda a que sub-classe das fosfatidiletanolaminas pertencem os iões (acil ou alquilacil). (Simoes, Simoes et al. 2008) (Kim, Min et al. 2009) (Ramanadham, Hsu et al. 1998)

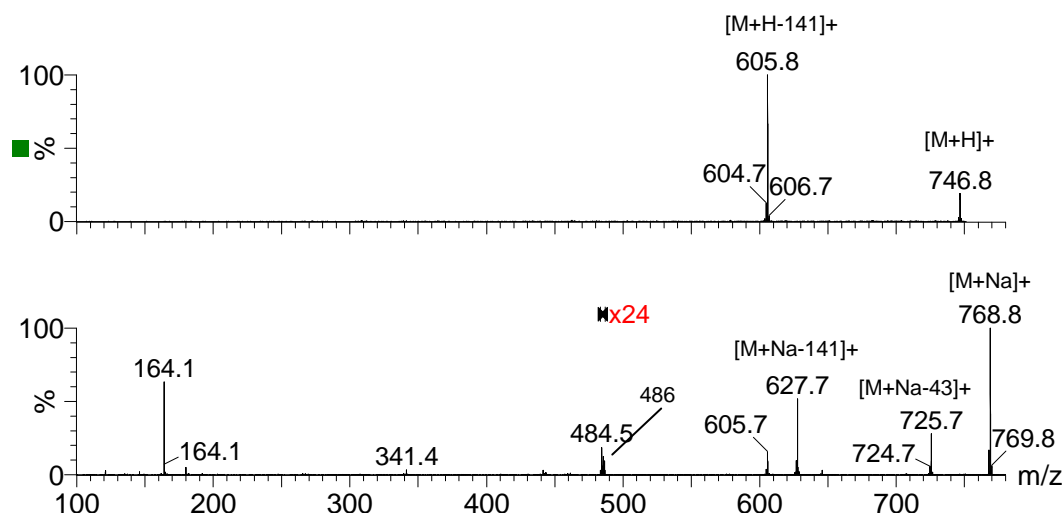
**Tabela 2: Fosfatidiletanolaminas pertencentes às DCs identificadas no modo positivo**

Diacil				Alquilacil			
$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	C:N	Espécies moleculares	$[M+H]^+$	C:N	$[M+Na]^+$	Espécies moleculares
				702	724	34:2	O-16:0/18:2
<b>716</b>	738	34:2	16:0/18:2				
<b>718</b>	740	34:1	16:0/18:1				
<b>720</b>		34:0	16:0/18:0				
				728	750	36:3	O-18:0/18:3
				732		36:1	O-20:0/16:1
<b>746</b>		36:1	18:0/18:1	760		38:1	O-20:0/18:1
<b>748</b>		36:0	18:0/18:0				
<b>764</b>		38:6	18:1/20:5				
<b>766</b>		38:5	18:1/20:4				
<b>768</b>		38:4	18:0/20:4				
<b>824</b>		42:4	22:1/20:3				
<b>828</b>		42:2	24:0/18:2				

Todas as fosfatidiletanolaminas apresentadas na tabela 3 foram identificadas pela análise dos seus espectros de ESI-MS/MS. Alguns destes fosfolípidos aparecem no espectros de ESI-MS na forma de iões  $[M+H]^+$  e também de  $[M+Na]^+$ . Nestes casos foram obtidos os espectros de MS/MS para ambos os iões do mesmo fosfolípido, pois fornecem informação complementar.



Como exemplo de fragmentação típica das PE, apresentamos os espectros do ião de  $m/z$  746, atribuído à molécula protonada  $[M+H]^+$  e do ião de  $m/z$  768, correspondente ao aducto de sódio  $[M+Na]^+$  da PE 18:0/18:1.



**Figura 21: Espectros de ESI-MS/MS da PE O-18:1/18:0**

**a)  $[M+H]^+$  de  $m/z$  746 e b)  $[M+Na]^+$  de  $m/z$  768.**

Tal como se pode ver no espectro apresentado na Figura 21, o ião produto  $[M+H-141]^+$ ,  $m/z$  605, formado por quebra entre o grupo fosfato e o glicerol, e correspondente à perda da cabeça polar, é o ião diagnóstico da presença desta classe de fosfolípidos. ( $m/z$  746), Este é alias, o ião fragmento mais abundante do espectro de MS/MS das PE protonadas (Figura 21 e Figura 22).

Por outro lado, o iões característicos dos espectros de ESI-MS/MS dos aductos  $[M+Na]$  das PE, correspondem aos iões  $[M+Na-43]^+$  ( $m/z$  725) e  $[M+Na-141]^+$  ( $m/z$  627). Depois de ampliada a zona de  $m/z$  entre 450 a 500 são visíveis os picos correspondentes a perdas dos ácidos gordos, correspondentes aos iões  $[M+Na-R_1COOH]^+$  ( $m/z$  484) e  $[M+Na-R_2COOH]^+$  ( $m/z$  486), (Figura 21 e Figura 23)

Avaliação do Perfil Lipídico de Células dendríticas imaturas e maduras por espectrometria de massa

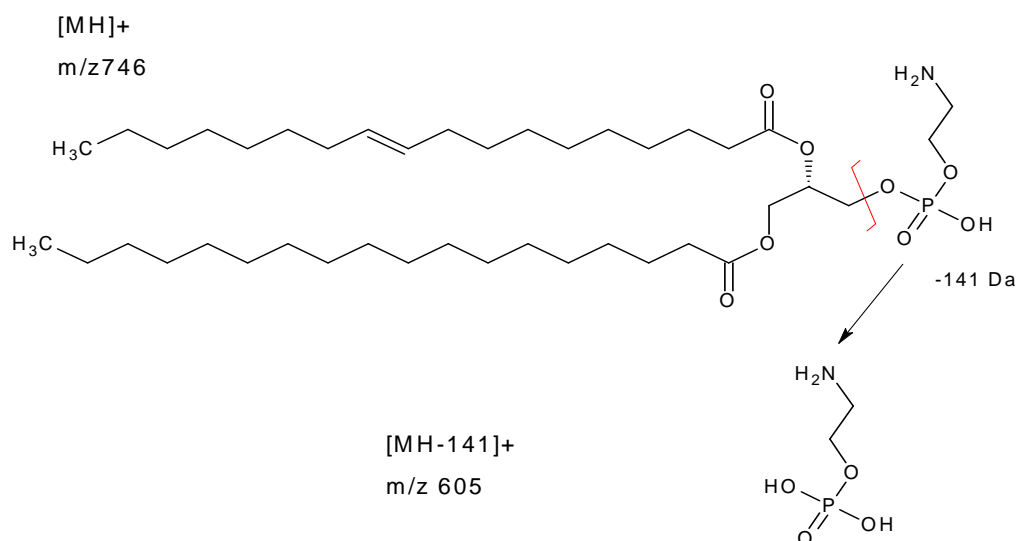


Figura 22: Estrutura da fosfatidiletanolamina PE 18:0/18:1 e fragmentação característica da classe das PE  $[M+H]^+$  no modo positivo.

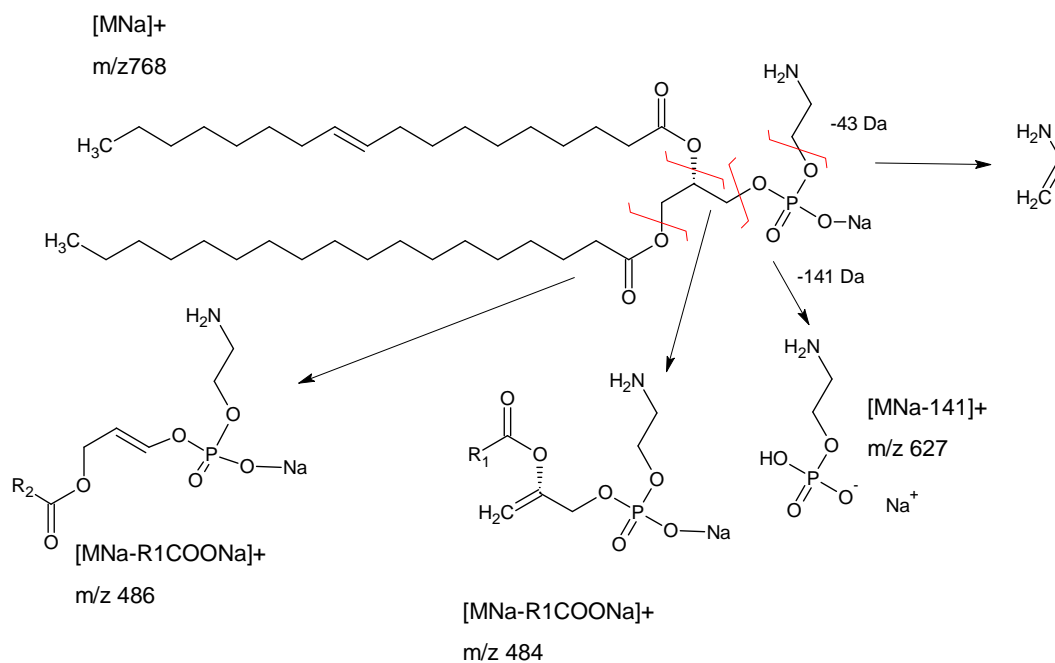


Figura 23: Estrutura da fosfatidiletanolamina PE 18:0/18:1 e fragmentação característica da classe das PE  $[M+Na]^+$  no modo positivo

Em seguida, apresentamos as vias de fragmentação observadas para os alquilacilPE, também observados nos espectros de ESI-MS quer para as células DC imaturas, quer DC maduras. No espectro de ESI-MS/MS iões  $[M+H]^+$  de  $m/z$  732, correspondente à alquilacil PE O-20:0/16:1, apresentado na Figuras 24 e 25, exemplificamos as perdas características destes fosfolípidos.

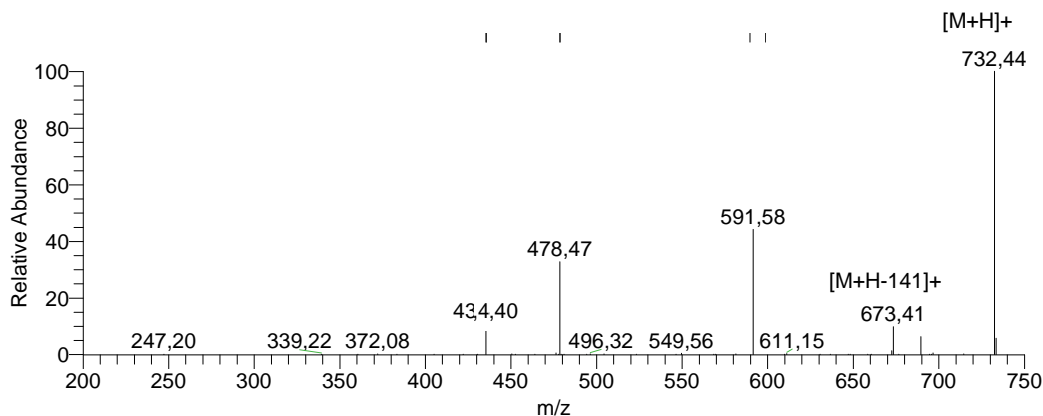


Figura 24: Espectro de ESI-MS/MS da PE O-20:0/16:1  $[M+H]^+$  de  $m/z$  732

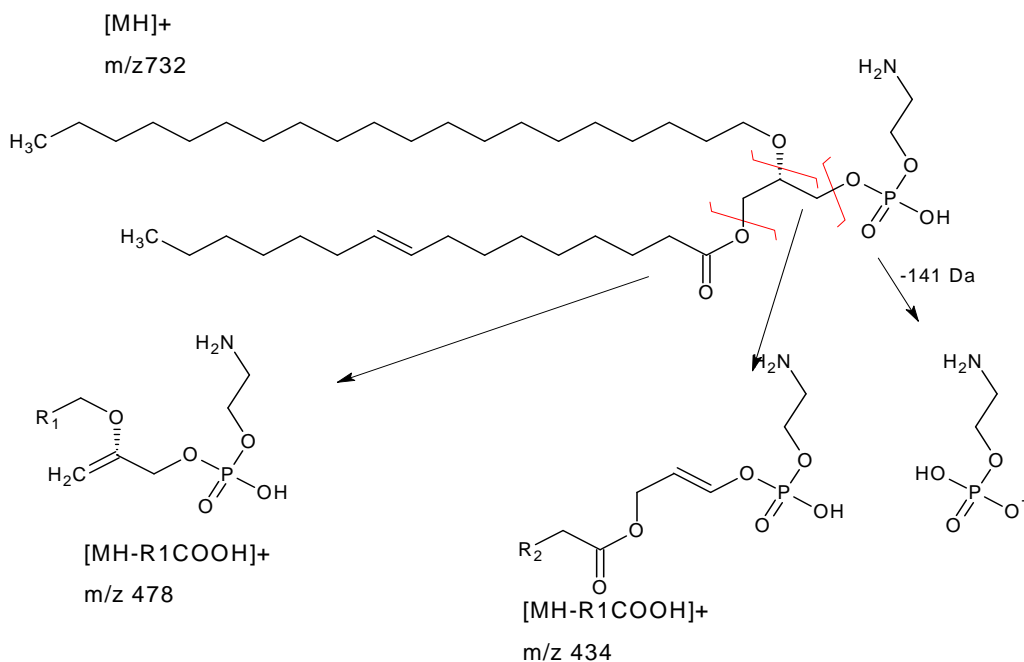
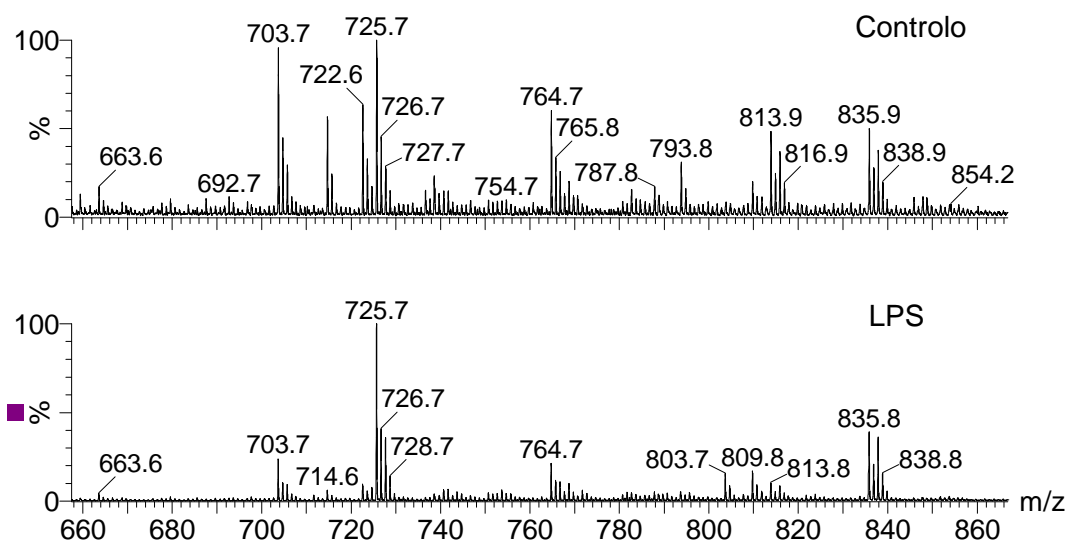


Figura 25: Estrutura da alquilacilfosfatidiletanolamina PE O-20:0/16:1 e fragmentação característica da classe das PE  $[M+Na]^+$  no modo positivo.

No espectro de MS/MS da alquilacilPE protonada  $[M+H]^+$  ( $m/z$  732) (Figura 24) podemos ver o pico característicos da classe das etanolaminas, correspondente á perda da cabeça da etanolamina  $[M+H-141]$  ( $m/z$  591) e as perda dos ácidos gordos,  $[M+H-R_1OH]^+$  ( $m/z$  434) e  $[M+H-R_2COOH]^+$  ( $m/z$  478) (Figura 25).

Assim, utilizando esta abordagem baseada na análise dos espectros de MS/MS foi possível identificar os fosfolípidos pertencentes à classe das PE.

### 3.3.3 Esfingomieline



**Figura 26: Espectro de ESI-MS de esfingomielinas separados por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS) no modo positivo**

Sabe-se que as esfingomielinas têm importantes funções na sinalização celular e também são constituintes das membranas citoplasmáticas, nomeadamente, fazendo parte integrante dos domínios membranares designados de “Lipid rafts”. Nos espectros de ESI-MS (Figura 26) obtidos para os diferentes spots identificados como SM podemos observar vários iões correspondentes a diferentes esfingomielinas pertencentes ao perfil lipídico das DCs, e comuns a ambas as populações de DCs.

Curiosamente, após análise mais detalhada da comparação dos espectros podemos verificar que existem diferenças entre os espectros de DCs imaturas e maduras nas

abundâncias relativas de algumas espécies destas classes de fosfolípidos assim, no espectro de ESI-MS das DCs maduras, observa-se uma menor abundância relativa das SM d18:1/16:0 ( $m/z$  703), da SM d18:1/24:1 ( $m/z$  813), e da d18:1/24:0 ( $m/z$  815).

Na Tabela 3 apresentamos os valores de  $m/z$  e as esfingomielinas correspondentes, pertencentes às DCs, apresentando as esfingomielinas através da sua base de cadeia longa (LCB) e do ácido gordo.

**Tabela 3: Esfingomielinas pertencentes às DCs identificadas no modo positivo,**

$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	LCB	Espécies moleculares
<b>703</b>	725	d18:1	16:0
<b>789</b>		d18:0	22:0
<b>809</b>		d18:0	24:4
<b>813</b>	835	d18:1	24:1
<b>815</b>	837	d18:1	24:0

A LCB mais frequente nas esfingomielinas é a d18:1 que corresponde á esfingosina. Encontramos ainda a LCB d18:0 que corresponde á esfingasina.

A fragmentação das SM é muito semelhante á das PC, pois ambas apresentam o mesmo grupo colina na cabeça polar. Como consequência, o ião mais abundante da fragmentação do ião  $[MH]^+$  (é observado no espectro de MS/MS) apresenta um valor de  $m/z$  184 e corresponde á perda da cabeça da colina. Assim, como exemplo de fragmentação típica das SM, apresentamos os espectros do ião de  $m/z$  703, atribuído á molécula protonada  $[MH]^+$ , e a 725 (Figura 27) e do seu aducto de sódio  $[MNa]^+$  (Figura 28) da SM d18:1/16:0.

A diferença mais evidente entre estas duas classes. PC versus SM, é o facto de os iões da classe das esfingomielinas apresentaram valor de  $m/z$  ímpar (em consequência de possuírem massa molecular de valor par), ao contrário das PC cujos iões têm valor par.

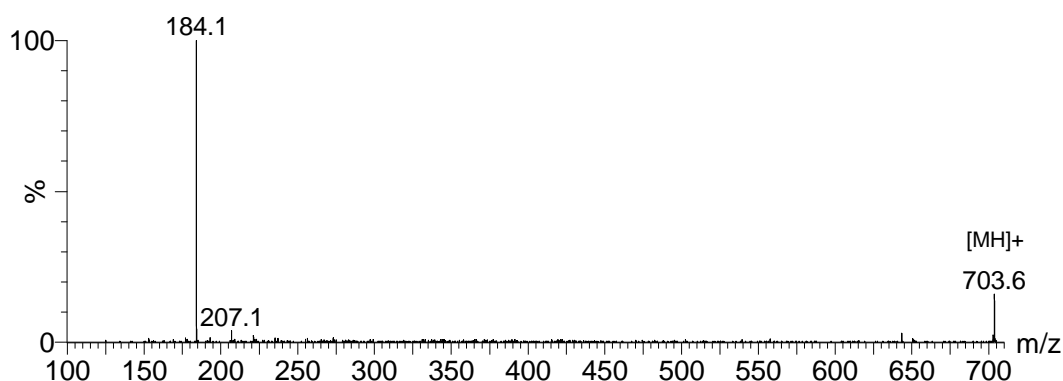


Figura 27: Espectros de ESI-MS/MS  $[MH]^+$  de m/z 703 correspondente à SM d18:1/16:0.

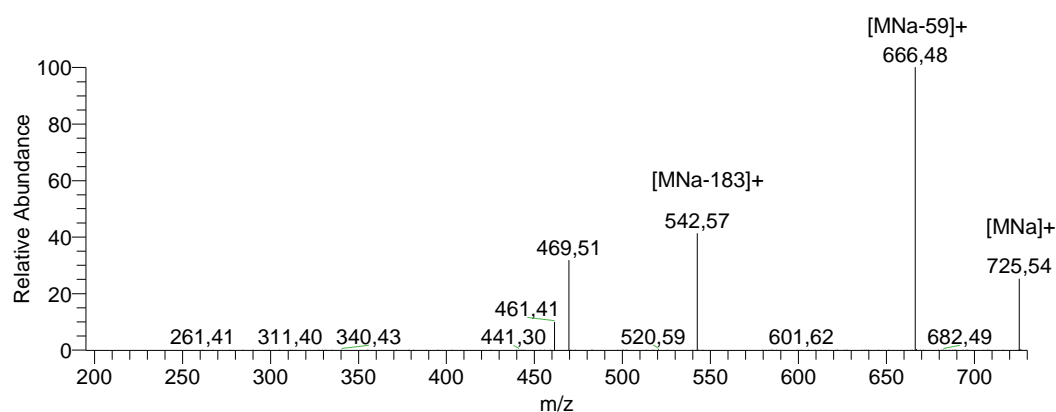


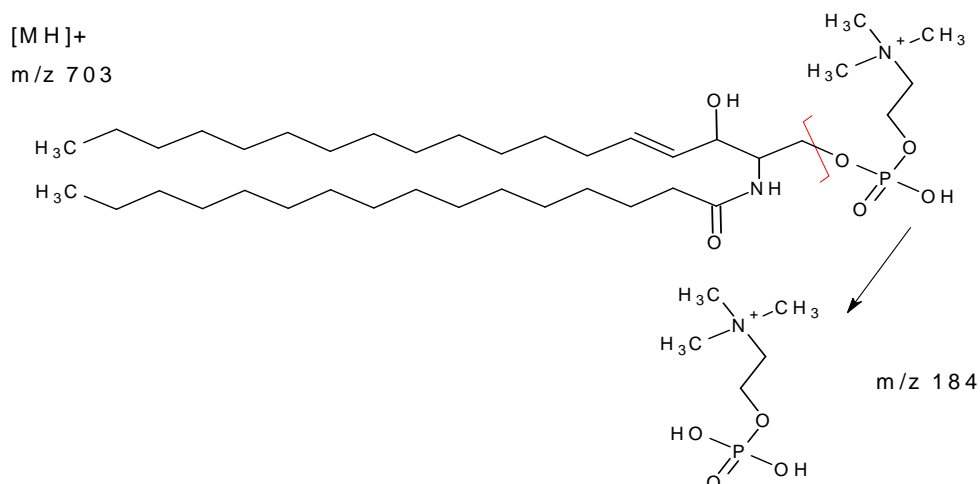
Figura 28: Espectro de ESI-MS/MS  $[MNa]^+$  da SM d18:1/16:0 (m/z 725)

No primeiro espectro (Figura 27), correspondente à fragmentação do ião  $[MH]^+$  da SM d18:1/16:, de m/z 703 observa-se o ião produto de m/z 184 correspondente à cabeça da colina (Figura 30).

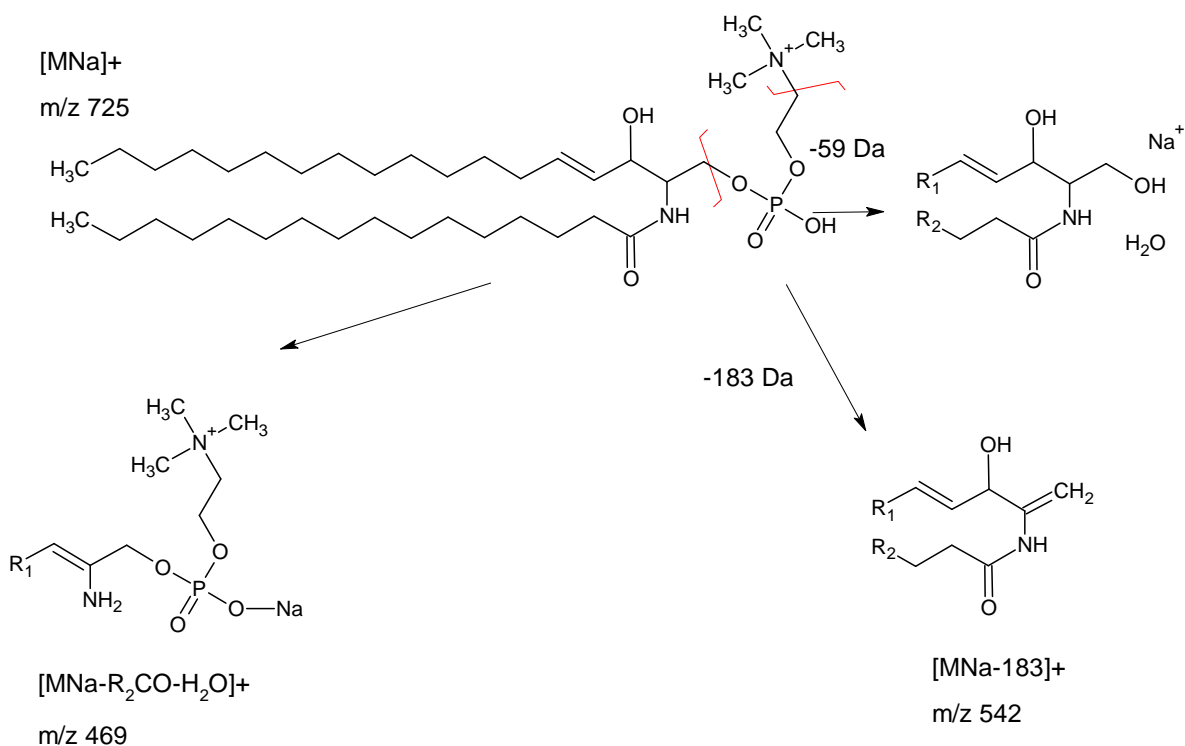
No espectro inferior (Figura 28) visualizamos a fragmentação do aducto de sódio  $[MNa]^+$  (m/z 725) da mesma SM, e as perdas características das esfingomielinas sodiadas:  $[MNa-59]^+$  (m/z 666),  $[MNa-183]^+$  (m/z 542) e  $[MNa-205]^+$  (m/z 520). Observamos também a perda do ácido gordo na forma de  $RCOOH$ , com formação do ião de m/z 469, e também se vê um ião correspondentes à perda da esfingosina (m/z 461) (

Figura 29). Estas vias de fragmentação permitem confirmar a estrutura destes fosfolípidos. (Manicke, Wiseman et al. 2008) (Haynes, Allegood et al. 2009).

## Estudo do perfil Lipídico de Células Dendríticas



**Figura 29: Estrutura da esfingomielina SM d18:1/16:0 e fragmentação característica da classe das SM no modo positivo  $[MH]^+$**



**Figura 30: Estrutura da esfingomielina SM d18:1/16:0 e fragmentação característica da classe das SM no modo positivo  $[MNa]^+$**

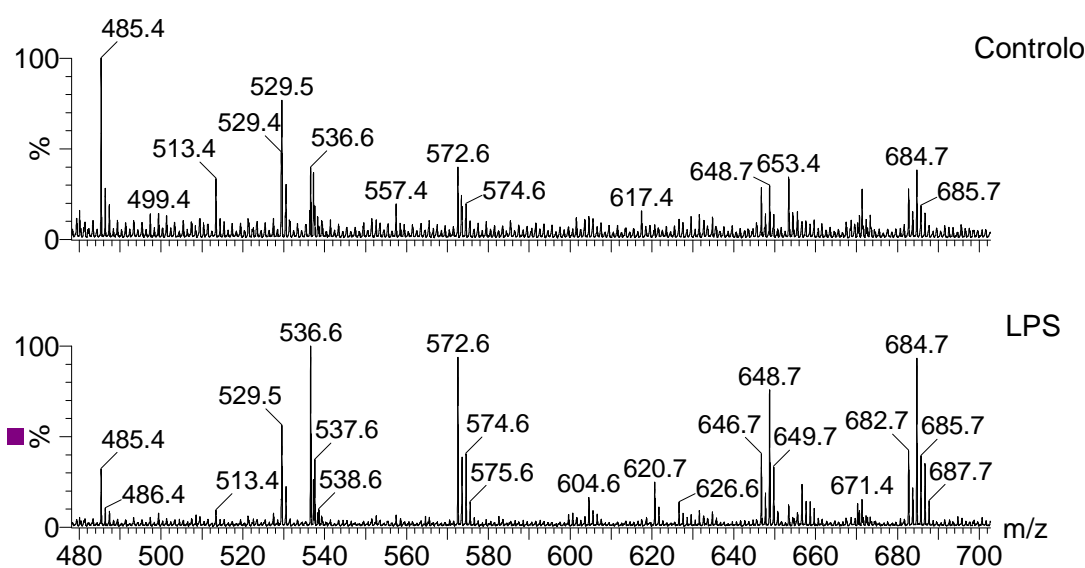
Aplicando esta metodologia a todos os iões observados nos espectros de ESI-MS do spot de esfingomielinas, podemos confirmar a estrutura de todas as SM identificadas, de acordo com o apresentado na tabela 4.

### **Análise dos espectros de ESI-MS e ESI-MS/MS no modo negativo**

Como já referimos anteriormente, existem alguns fosfolípidos que ionizam preferencialmente com formação de iões negativos, nomeadamente formação de iões  $[M-H]^-$ . Estas classes são as PI, PG, PS e ceramidas. Os spots foram destas classes de fosfolípidos foram apenas analisadas em ESI-MS e ESI-MS/MS no modo negativo e serão descritos a seguir.

#### **3.3.4 Ceramida**

As ceramidas são lípidos bioativos que têm importantes funções em processos biológicos, entre os quais a sinalização celular e a inflamação. Nos espectros ESI-MS apresentados na Figura 31, pode-se observar a composição em ceramidas pertencentes ao perfil lipídico das DCs, imaturas e maduras.



**Figura 31: Espectro de ESI-MS de ceramidas separados por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS) no modo negativo**

Na análise do extracto lipídico celular total, tinha-se observado o aparecimento de ceramidas, a  $m/z$  536 e 648 para as DC imaturas. Após separação das classes lipídicas, verificámos que as ceramidas também existem nas DC imaturas, mas observam-se diferenças nas abundâncias relativas de um relevante número destes lípidos neutros, em especial um aumento para as DC maduras. Assim as ceramidas d18:1/16:0, d18:1/24:1, d18:1/24, observadas como  $[M-H]^-$  de  $m/z$  536, 646 e 648 apresentam maior abundância



relativa no espectro das DC maduras. Os iões de  $m/z$  572, 682 e 684 que também apresenta uma maior abundância relativa no espectro correspondem aos aductos de  $[M-Cl]^-$  das ceramidas referidas anteriormente.

É assim visível uma acentuada alteração do perfil de ceramidas nas DCs maduras, corroborando os dados de ESI-MS do extracto total.

Na Tabela 4 apresentamos os valores de  $m/z$  e as ceramidas correspondentes, pertencentes às DCs, da mesma forma que apresentamos para as esfingomielinas, através da constituição em LCB e ácidos gordos. Esta semelhança entre as ceramidas e esfingomielinas, aplica-se pois ambas são esfingolipidos, diferindo apenas na cabeça, onde a ceramida apenas tem um hidrogénio e a esfingomielina contem a cabeça da colina. Esta comparação será abordada mais á frente.

Algumas das ceramidas têm associadas o seu aducto de cloro ( $[M-Cl]^-$ ) (Holopainen, Lemmich et al. 2000; Kanto, Kalinski et al. 2001).

**Tabela 4: Ceramidas pertencentes às DCs identificadas no modo negativo**

$[M-H]^-$	LCB	Espécie molecular	$[M-Cl]^-$	LCB	Espécie molecular
536	d18:1	16:0	572	d18:1	16:0
630	d18:1	23:2			
632	d18:1	23:1			
634	d18:1	23:0			
646	d18:1	24:1	682	d18:1	24:1
648	d18:1	24:0	684	d18:1	24:0

As ceramidas variam em constituição de ácidos gordos, no entanto apresentam todas a mesma LCB, a esfingosina.

A composição destas ceramidas (Tabela 5) , foram confirmadas pela análise dos seus espectros de ESI-MS/MS .O espectro de ESI-MS/MS das ceramidas tem várias perdas características, como se pode observar na Figura 32, que representa os espectro de ESI-MS/MS da ceramida d18:1/16:0, com ião  $[M-H]^-$  de  $m/z$  536. As vias de fragmentação correspondentes encontram-se resumidas na Figura 33.

## Avaliação do Perfil Lipídico de Células dendríticas imaturas e maduras por espectrometria de massa

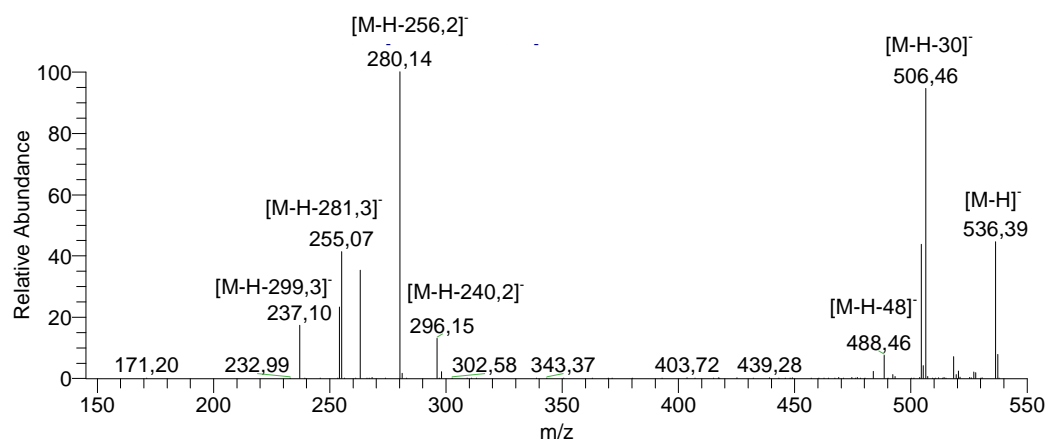


Figura 32: Espectros de ESI-MS/MS do ião 536 m/z (cer d18:1/16:0).

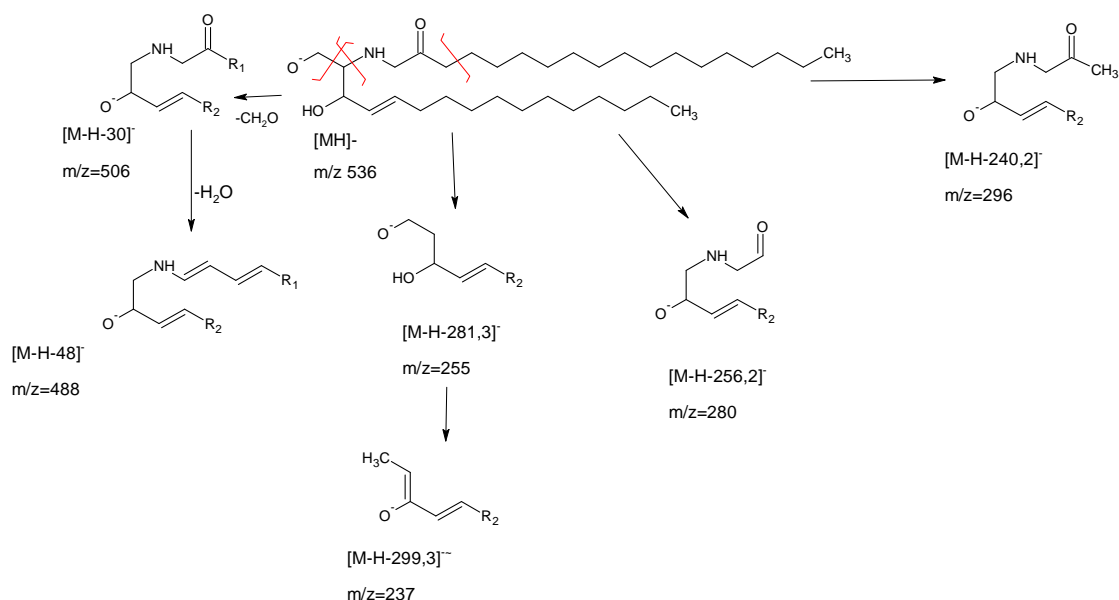
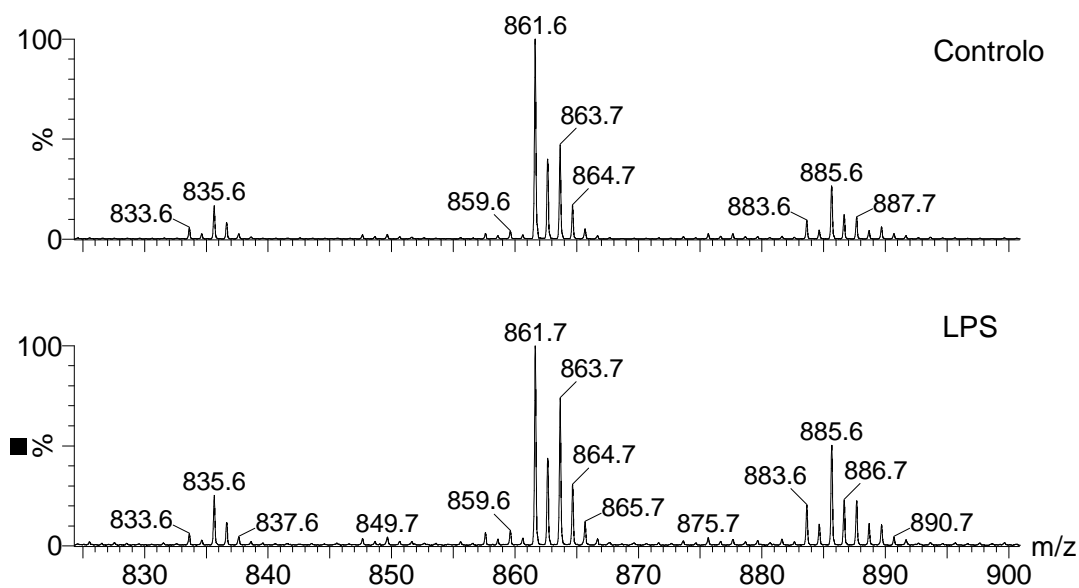


Figura 33: Estrutura da ceramida d18:1/16:0 e fragmentação característica da classe das cer no modo negativo

A fragmentação das ceramidas é caracterizada por várias perdas e fragmentações típicas: perda de  $\text{H}_2\text{C}=\text{O}$  (-30 Da, ião m/z 506), perda combinada de  $\text{H}_2\text{C}=\text{O}$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (-30-18 Da, ião m/z 488), perda de molécula neutra com 240 Da (ião m/z 296), perda de molécula neutra com 256 Da (ião m/z 280), tal como representado na Figura 33. (Raith and Neubert 1998; Vietzke, Brandt et al. 2001; Han 2002; Hsu and Turk 2002)

### 3.3.5 Fosfatidilinositol

Para além dos ácidos gordos e do grupo fosfato, característico dos fosfolípidos, as fosfatidilinositois contêm um açúcar, o inositol, ligado ao grupo fosfato. Na Figura 34 apresentamos o perfil das PI em DCs. Não observámos diferenças significativas entre DCs imaturas e maduras.



**Figura 34: Espectro de ESI-MS de fosfatidilinositol separados por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS) no modo negativo**

Nesta classe observamos a PI 18:1/18:1, com ião  $[M-H]^-$  de m/z 861 como maioritária.

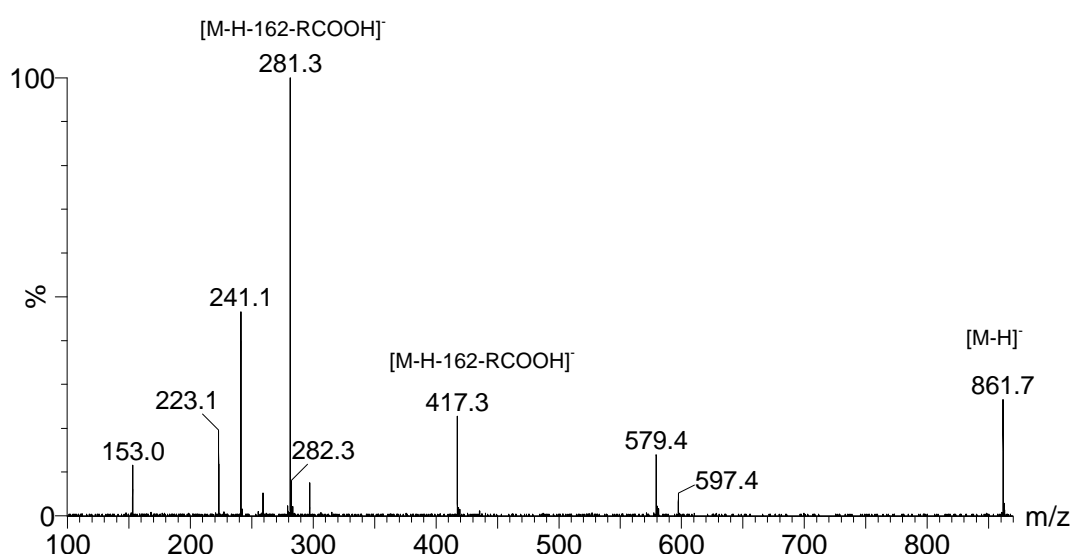
Apresentamo, na tabela 5, os valores de  $m/z$  e as fosfatidilinositois correspondentes, pertencentes às DCs, segundo a sua composição em ácidos gordos. (Quehenberger, Armando et al. 2008)

**Tabela 5: Fosfatidilinositois pertencentes às DCs identificadas no modo negativo**

$[M-H]^-$	C:N	Espécie molecular
835	34:1	16:0/18:1
857	36:4	16:0/20:4
861	36:2	18:1/18:1
883	38:5	18:1/20:4
885	38:4	18:0/20:4
		20:3/18:1
909	40:6	18:1/22:5
911	40:5	18:0/22:5

Na tabela 6 observamos o ião de  $m/z$  885 com duas possíveis identificações, isto porque neste valor de  $m/z$  e através do espectro de ESI-MS/MS conseguimos perceber a presença de duas espécies da mesma classe, assim identificamos as duas, sabendo que a PI 18:0/20:4 é maioritária.

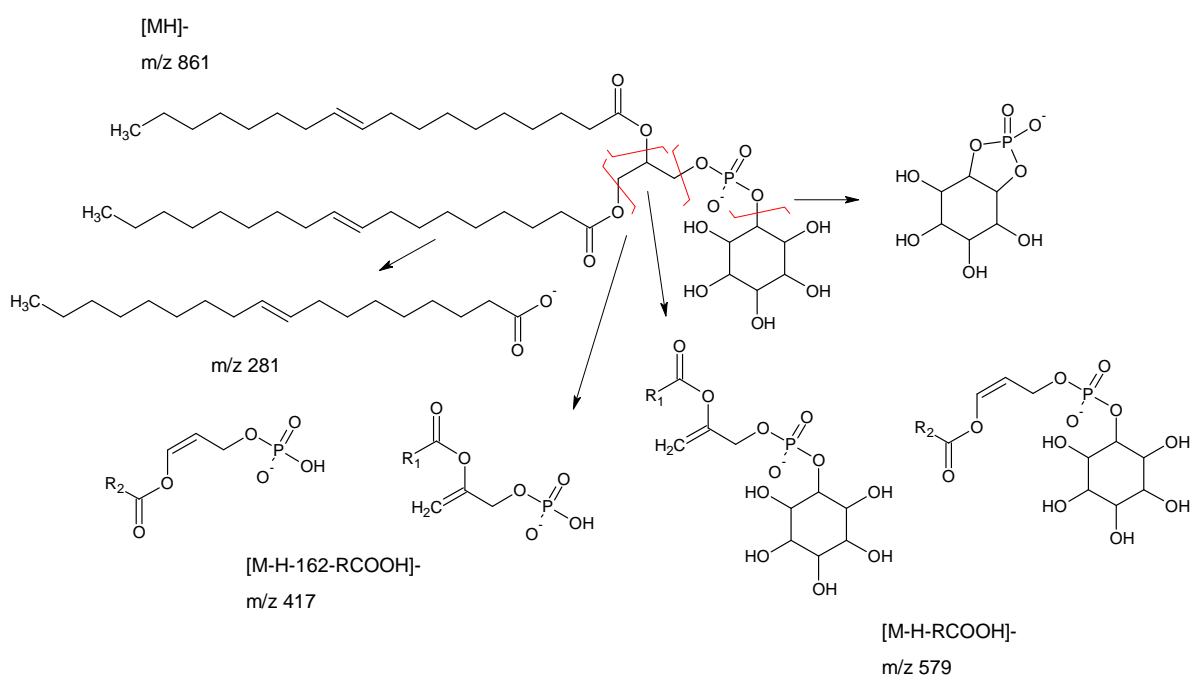
Na figura seguinte apresentamos a fragmentação característica da classe das PI, exemplificado pelo espectro de ESI-MS/MS do ião  $[M-H]^-$  da PI 18:1/18:1, de.  $m/z$  861. (Hsu and Turk 2000) (Hsu, Turk et al. 2007)



**Figura 35: Espectros de ESI-MS/MS do ião 861  $m/z$  (PI 18:1/18:1)**

A fragmentação das PI têm como pico característico o ião de  $m/z$  241 ( Figura 36). Geralmente as PI têm perdas de  $m/z$  162 ( $m/z$  417), relacionadas com a perda do açúcar (Figura 36).

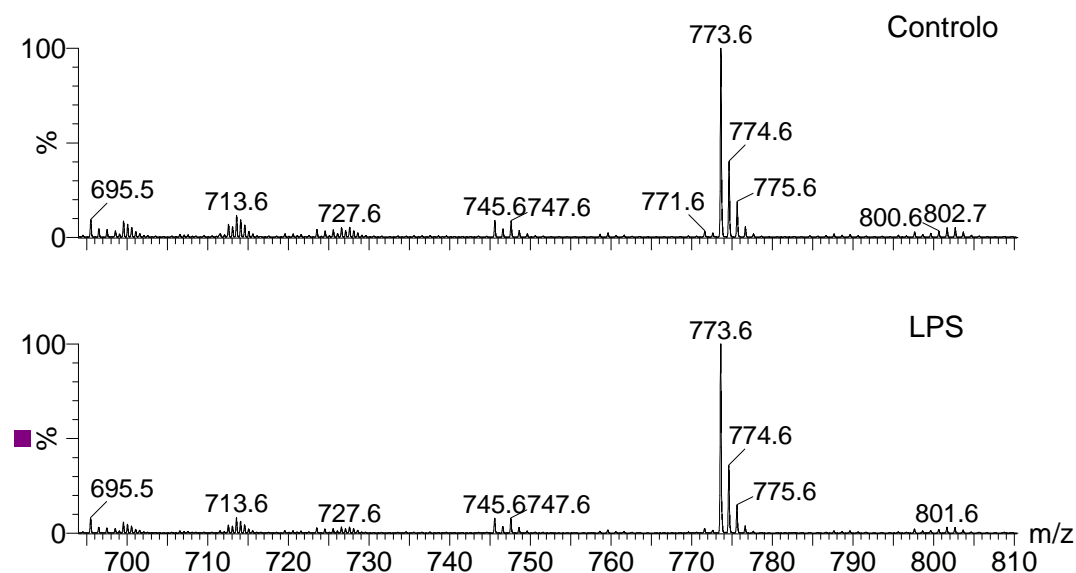
Na Figura 35 podemos ainda observar o ião 281, que corresponde ao ácido gordo na forma  $[RCOO]^-$  e o ião 579, que representa a perda deste ácido gordo  $[M-H-RCOOH]^-$  (Figura 37).



**Figura 36: Estrutura da fosfatidilinositol 18:1/18:1 e fragmentação característica da classe das PI no modo negativo**

### 3.3.6 Fosfatidilglicerol

A figura seguinte (Figura 37) apresenta o perfil de PG identificado nas DCs, após a separação por cromatografia em camada fina. Não encontramos diferenças significativas entre DCs imaturas e maduras, no perfil desta classe.



**Figura 37: Espectro de ESI-MS de fosfatidilglicerol separados por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS) no modo negativo**

Como podemos observar nos espectros da Figura 37 o perfil das PG em DCs é composto essencialmente pela PG 18:1/18:1, com ião  $[M-H]^-$  de m/z 773, que se destaca dos outros por ser muito abundante.

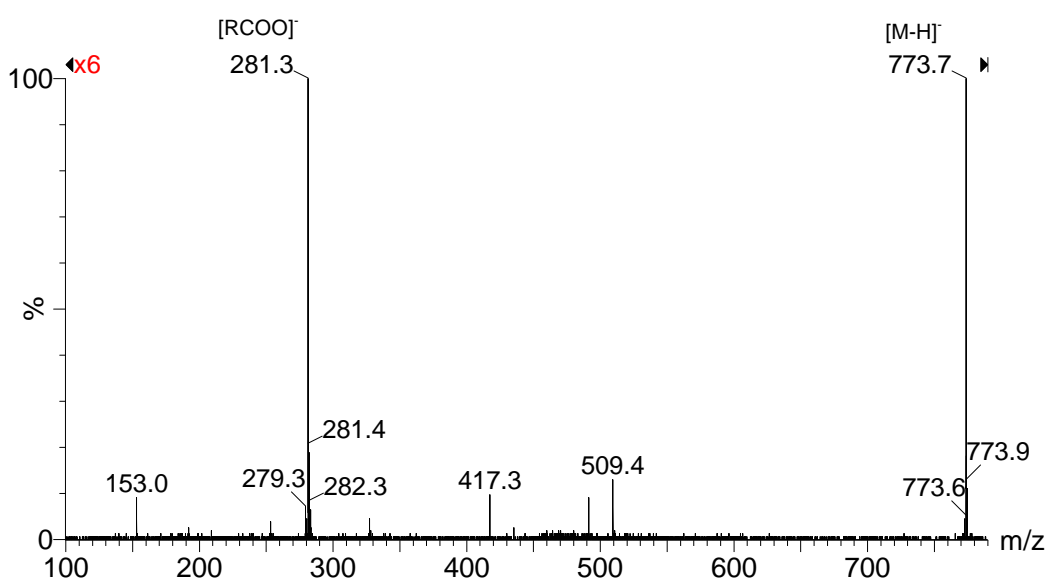
Na tabela seguinte apresentamos as diferentes espécies de PG identificadas nas DCs.

**Tabela 6: Fosfatidilglicerol pertencentes às DCs identificadas no modo negativo**

[M-H] <sup>-</sup>	C:N	Espécie molecular
719	32:1	16:1/16:0
743	34:3	18:2/16:1
745	34:2	18:1/16:1
747	34:1	18:1/16:0
769	36:4	18:1/18:3
771	36:3	18:1/18:2
773	36:2	18:1/18:1
797	38:4	20:3/18:1
799	38:3	20:2/18:1
801	38:2	20:1/18:1

Nesta classe podemos observar uma característica comum a quase todas as espécies identificadas. Excepto o ião m/z 743, todas as restantes espécies contêm o ácido oleico (18:1) na sua composição. (Quehenberger, Armando et al. 2008)

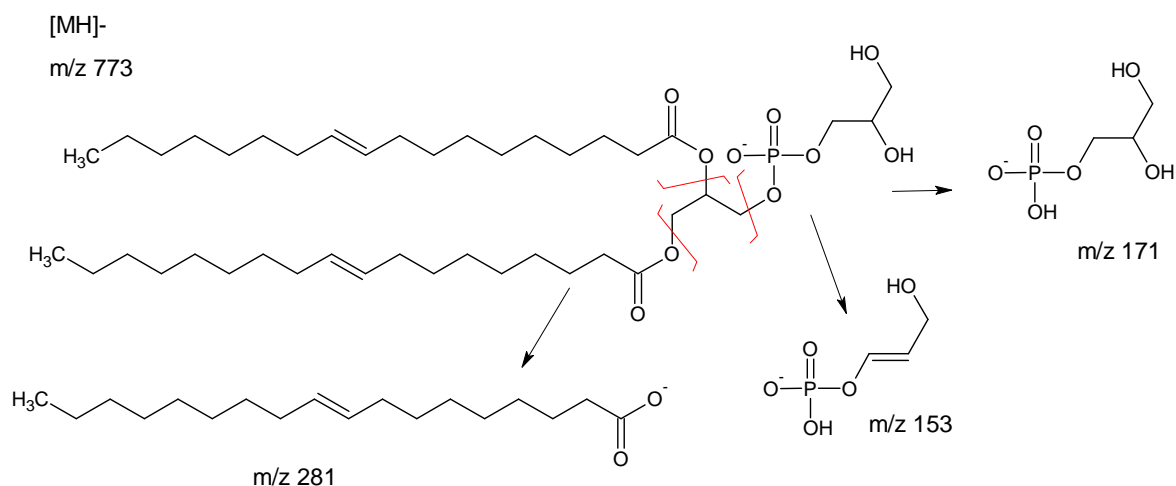
Como exemplo das vias de fragmentação e espectro característico das PG, apresentamos nas Figura 38 e Figura 39, o espectro de ESI-MS/MS e as estruturas de fragmentação do ião [M-H]<sup>-</sup> da PG 18.1/18:1. (Hsu and Turk 2009), (Kim, Ahn et al. 2008), (Postle 2009)



**Figura 38: Espectros de ESI-MS/MS do ião 773 m/z (PG 18:1/18:1)**

## Avaliação do Perfil Lipídico de Células dendríticas imaturas e maduras por espectrometria de massa

A fragmentação típica das PG baseia-se nos íões de  $m/z$  153, correspondente ao grupo fosfato ligado ao glicerol desidratado ( $C_3H_6O_5P$ ), e de  $m/z$  171 correspondente ao grupo fosfato ligado ao glicerol desidratado ( $C_3H_8O_6P$ ), como se mostra na Figura 39. Vemos ainda os ácidos gordos, na forma de  $[RCOO]^-$ , que no caso da PG 18:1/18:1, são o mesmo, a  $m/z$  281 (Figura 38). (Hein, Blank et al. 2009)

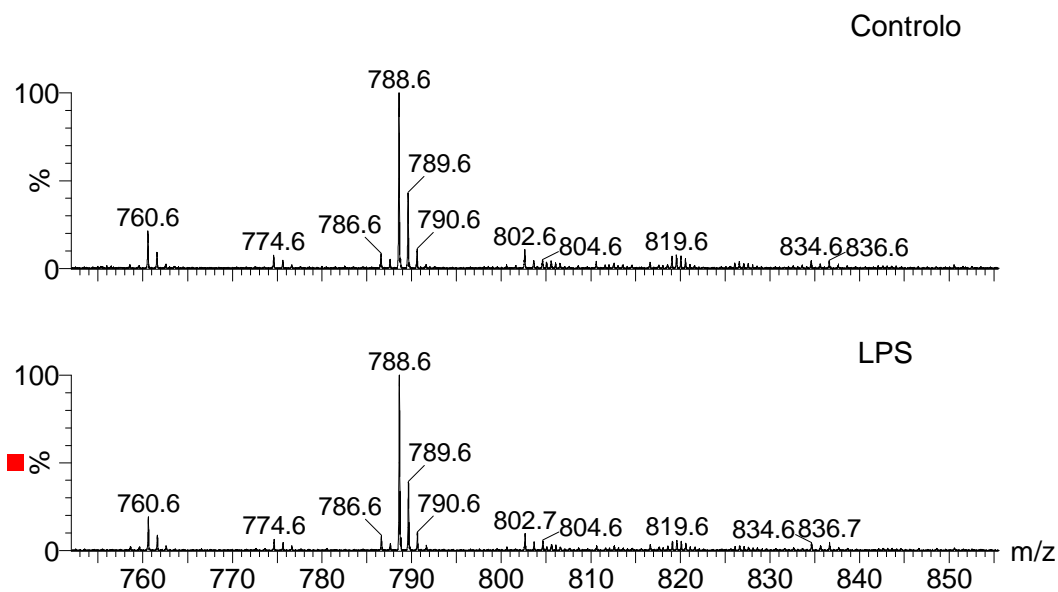


**Figura 39: Estrutura da fosfatidilglicerol PG 18:1/18:1 e fragmentação característica da classe das PG no modo negativo.**



### 3.3.7 Fosfatidilserina

A classe das PS é uma das classes menos abundantes nas DCs: Na figura seguinte apresentamos o perfil desta classe.



**Figura 40. Espectro de ESI-MS de fosfatidilserinas separados por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS) no modo negativo**

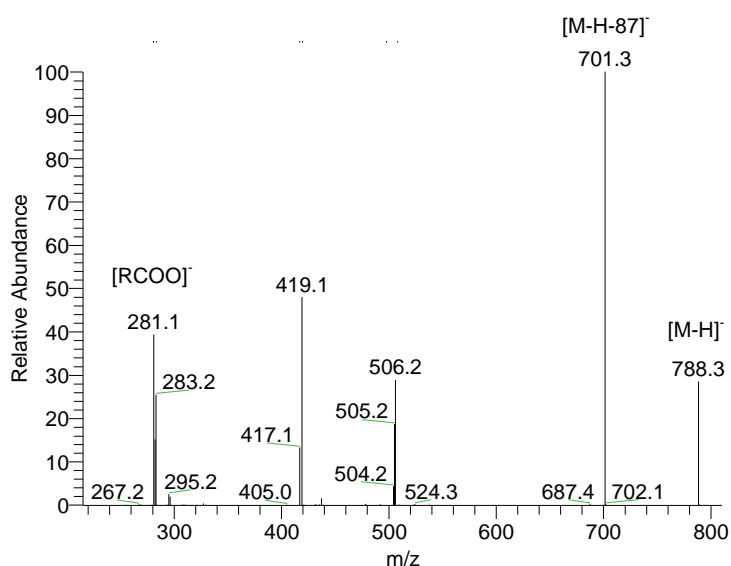
As espécies mais abundantes desta classe são a PS 18:1/18:0 (m/z 788) e 18:1/16:0 (m/z 760). Não observamos diferenças significativas entre DCs imaturas e maduras através do perfil de PS.

Na tabela seguinte apresentamos as diferentes espécies da classe das serinas que identificamos no modo negativo, nas DCs. Todas as espécies foram confirmadas pela análise do respectivo espectro de ESI-MS/MS dos iões  $[M-H]^-$ . (Ogiso, Suzuki et al. 2008) (Bayir, Tyurin et al. 2007)

**Tabela 7: Fosfatidilserina pertencentes às DCs identificadas no modo negativo**

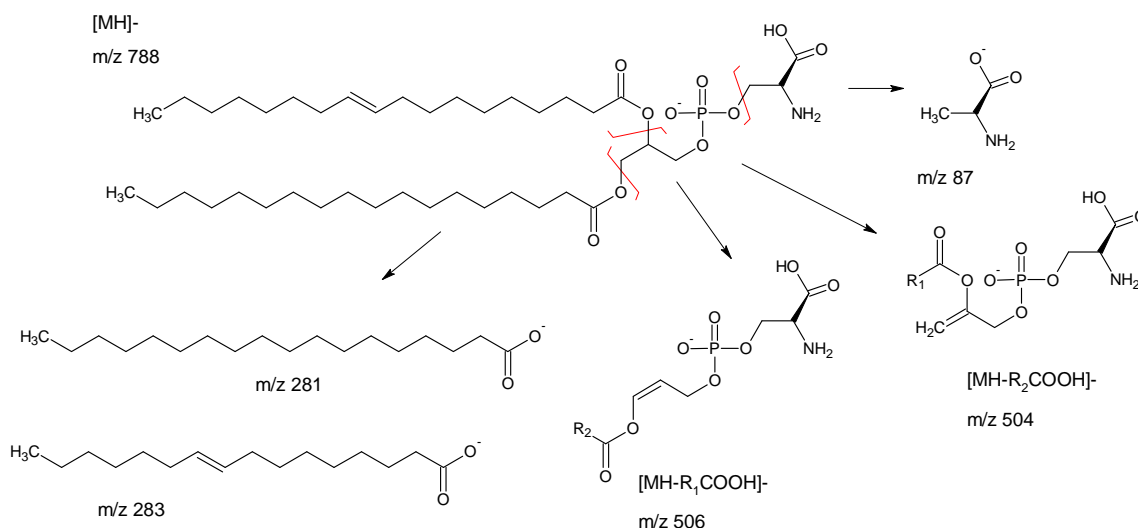
$[M-H]^-$	C:N	Espécie molecular
760	32:1	18:1/16:0
786	34:2	18:1/18:1
788	34:1	18:1/18:0
810	38:4	18:0/20:4
		16:0/22:4
812	38:3	18:0/20:3
834	40:6	18:0/22:6
836	40:5	18:0/22:5

No espectro abaixo apresentamos as perdas características da classe das PS, tomando como exemplo a PS 18:1/18:0, que são demonstradas na Figura 42, através das estruturas de fragmentação. (Bang, Ahn et al. 2007)



**Figura 41: Espectro de ESI-MS/MS do ião  $[M-H]^-$  da PS 18:1/18:0, de m/z 788**

A Figura 41( espectro de ESI-MS/MS da PS 18:1/18:0) podemos observar os ácidos gordos na forma de  $[RCOO]^-$ , a valor de  $m/z$  281 e 283, respectivamente. A identificação destes iões confirma a presença dos ácidos gordos C18:1 e C18:0 na molécula de PS. A composição em ácidos gordos é ainda confirmada pela presença dos iões fragmento de 506 e 504, que se formam pela perda do ácido gordo respectivo,  $-RCOOH$ , com formação do ião  $[M-H-RCOOH]^-$ . Neste espectro observam-se ainda as vias de fragmentação características das PS: Perda de 87 Da , com formação do ião  $[M-H-87]^-$  de  $m/z$  701) correspondente á perda da cabeça polar, bem com as perdas combinadas do grupo da cabeça e perdas dos ácidos gordos, iões  $[M-H-87-RCOOH]^-$  de  $m/z$  419 e 417. Todas estas estruturas de fragmentação estão apresentadas na Figura 42.



**Figura 42: Estrutura da fosfatidilserina PS 18:0/18:1 e fragmentação característica da classe das PS no modo negativo.**

### 3.4 Diferenças do perfil das esfingomielinas e das ceramidas, dependentes do estágio de maturação das DCs

Podemos constatar ao longo da análise do perfil lipídico das DC imaturas e maduras, as diferenças observadas reportam à classe das ceramidas e dos esfingomielinas. Como já referimos no capítulo 1 (Introdução), a esfingomielina, a ceramida e glicosfingolípido pertencem todos ao mesmo grupo de lípidos designados de esfingolípido.

As ceramidas são formadas a partir das esfingomielinas, através da acção da esfingomielinase, perdendo a cabeça da colina (Fonteh, Harrington et al. 2006). Assim, e por termos observado uma diminuição da abundância relativa de algumas SM nas DCs maduras e um aumento da abundância relativa de ceramidas nas DCs também maduras, questionámos se estes resultados seriam relacionáveis. Na Figura 43 apresentamos um esquema da acção da esfingomielinase, tomando por exemplo a SM d18:1/16:0 e a ceramida d18:1/16:0, que encontramos nas DCs maduras.

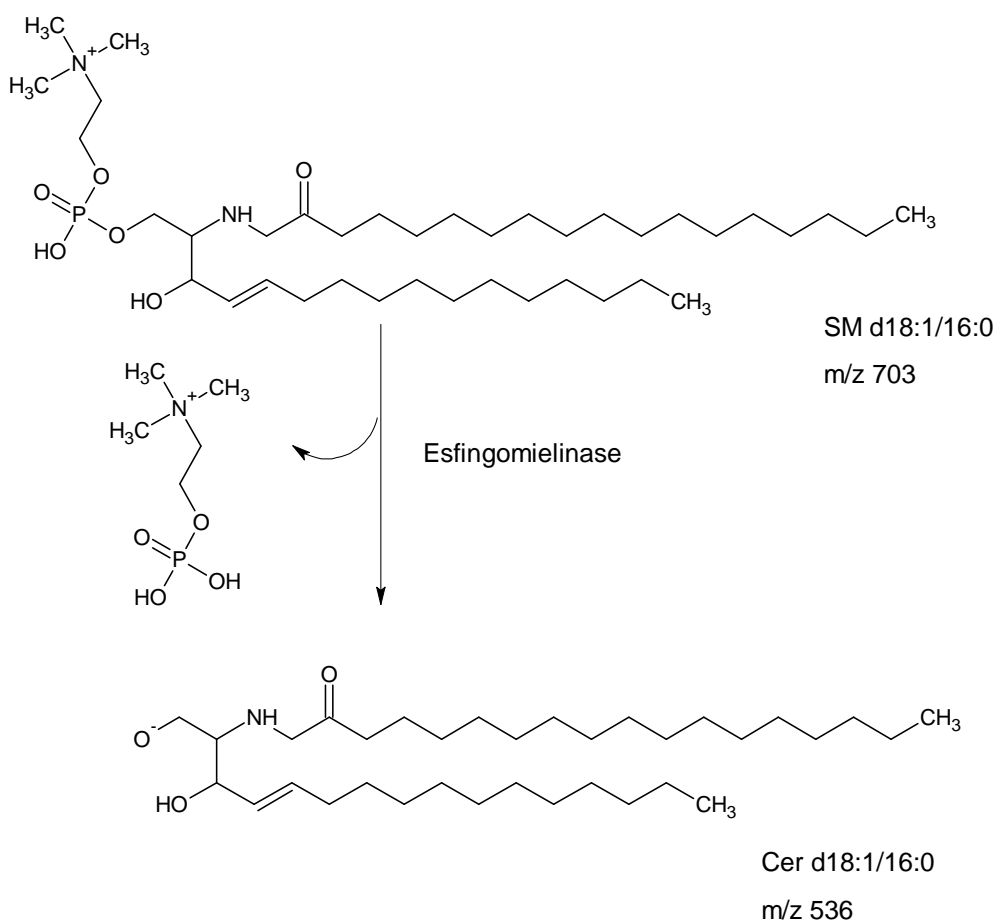


Figura 43: Metabolismo da esfingomielina e da ceramida.

De facto as SM que apresentaram variação, de constituição SM d18:1/16:0 de m/z 703, d18:1/24:1 de m/z 813 e SM d18:1/24:0 de m/z 815, apresentam a mesma composição em ácidos gordos do que as ceramidas que apresentaram um aumento da abundância relativa e que foram as ceramidas cer d18:1/24:1 de m/z 646 e a cer d18:1/24:0 de m/z 648. Podemos assim sugerir, que aquando das alterações fenotípicas e morfológicas das células dendríticas, que ocorrem durante a maturação das DC, ocorre uma maior actividade de esfingomielinas, com aumento de ceramidas, provavelmente para desempenharem um papel importante na sinalização mediada pelas células dendríticas maduras, na activação de outras células do sistema imune, nomeadamente de linfócitos T e consequentemente na activação da resposta imunológica adquirida.

### **3.4 Conclusões**

Neste capítulo pretendíamos avaliar possíveis alterações do perfil lipídico em DCs imaturas e maduras. Assim, inicialmente obtivemos os espectros de ESI-MS positivo e negativo dos extractos lipídicos totais. No modo positivo, não obtivemos diferenças significativas. No entanto no modo negativo, observamos um aumento de ceramidas nas DCs maduras.

Prosseguimos com a separação lipídica por cromatografia de camada fina. Na maioria das classes lipídicas, analisadas selectivamente quer no positivo (PC e PE) quer no negativo (PI, PG, PS) não observamos diferenças significativas. No entanto, confirmámos as alterações das ceramidas, já encontradas no espectro do extracto lipídico total, e detectamos também diferenças no perfil da classe das esfingomielinas.

Relacionamos então estas diferenças, podendo sugerir uma associação entre o decréscimo das esfingomielinas e o aumento das ceramidas, uma vez que estruturalmente apenas há a perda da cabeça da colina na formação de ceramidas a partir de esfingomielinas. Esta variação observável poderá ter um efeito biológico extremamente significativo, dada a grande importância das ceramidas em funções de sinalização

## **Capitulo 4**

### **Alteração do perfil lipídico induzida por alergénios e irritantes**

## 4 Avaliação do Perfil Lipídico induzida por alergénios e irritantes

### 4.1 Introdução

Neste capítulo será caracterizado o perfil lipídico de DCs expostas a um potente alergénio de contacto (DNFB) e a um irritante (SDS) em comparação com os resultados já obtidos no capítulo 3.

O DNFB (2,4-dinitrofluorbenzeno) é um alergénio de contacto, causador da dermatite de contacto alérgico. As DCs, mais especificamente as células de *Langerhans* (DCs de pele) estão envolvidas na sensibilização desta dermatite. Assim, como já foi referido anteriormente quando as DCs entram em contacto com alergénios, inicia-se o processo de maturação, no qual estas células sofrem alterações funcionais e fenotípicas, que lhes permitem estimular de um modo eficaz, os linfócitos T.

O SDS, ou dodecil sulfato de sódio, é um detergente surfactante, muito utilizado em cosmética e produtos de higiene. Este composto é um irritante, mas é incapaz de activar o processo de maturação das DCs, sendo por isso utilizado para comparação de resultados.

O perfil lipídico, tal como já foi referido no capítulo anterior, foi avaliado através de uma metodologia lipidómica (Wenk 2005; Wolf and Quinn 2008). Iniciou-se esta avaliação por uma caracterização lipídica através do extracto total de lipídios, por espectrometria de massa (ESI-MS) e espectrometria de massa tandem (ESI-MS/MS), quer no modo positivo como no modo negativo.

Em seguida, e de forma a obtermos resultados mais detalhados, efectuamos a separação de classes lipídicas por cromatografia de camada fina. Estas classes lipídicas, foram posteriormente caracterizadas por ESI-MS e ESI-MS/MS.



## 4.2 Análise por ESI-MS e ESI-MS/MS directa do extracto lipídico total

Após a extracção dos lípidos das DCs, pelo método de Bligh and Dyer (Bligh and Dyer 1959), obtivemos os espectros dos lípidos totais no modo positivo e negativo.

Tal como referimos no capítulo 3, esta análise do extracto total foi realizada dado que em alguns trabalhos foram observadas alterações do perfil lipídico em extractos totais.

### Análise dos espectros de ESI-MS no modo positivo

O espectro dos lípidos totais das DCs nas várias condições, obtidos no modo positivo foram realizados, para vários extractos, e em vários dias, tendo-se obtido resultados reprodutíveis e concordantes. A Figura 44 é um exemplo dos espectros obtidos nestes ensaios.

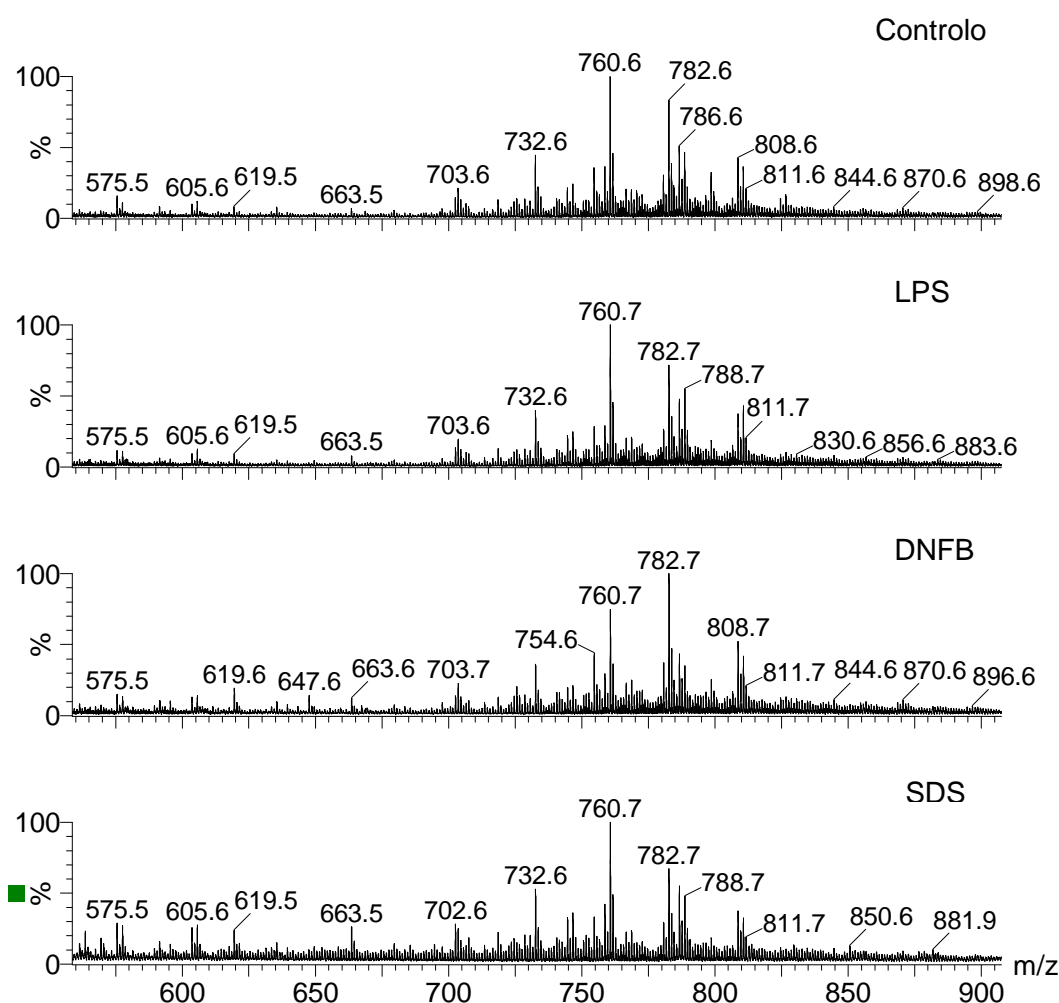


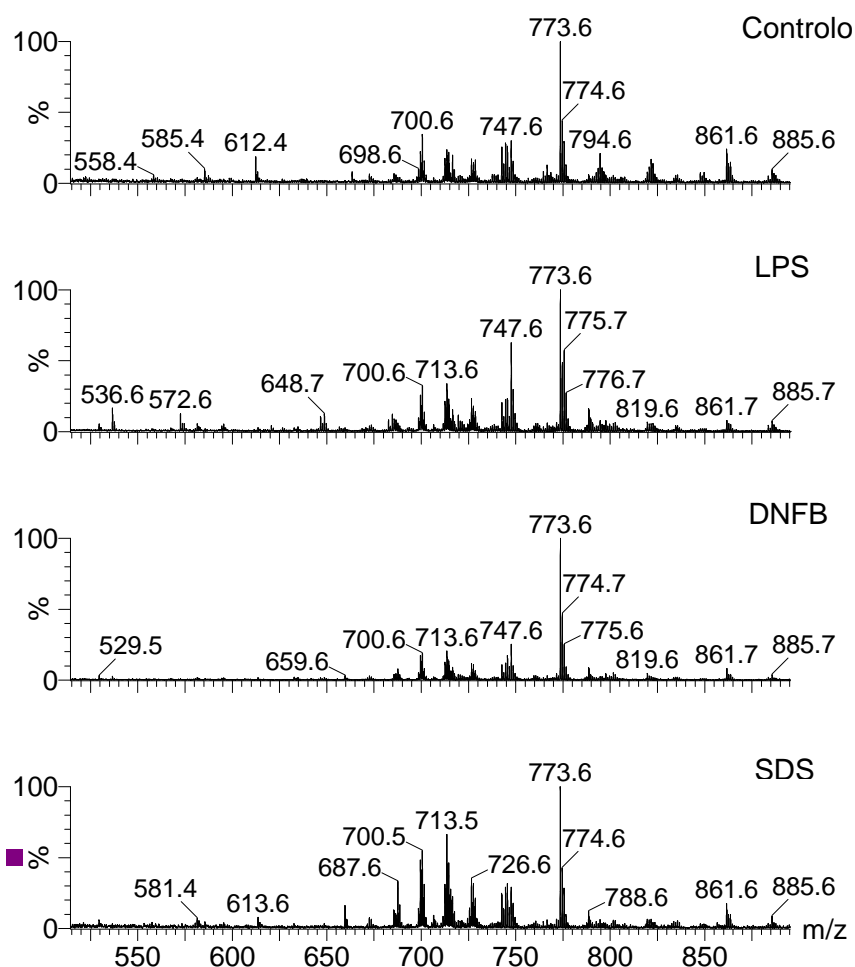
Figura 44: Espectro directo de ESI-MS de fosfolípidos extraídos de células dendríticas imaturas (controlo), maduras (LPS), expostas a alérgenos (DNFB) e a irritantes (SDS) no modo positivo.

Nos espectros de massa obtidos por ESI-MS no modo positivo observamos vários iões de maior abundância relativa que correspondem aos fosfolípidos protonados  $[M+H]^+$  e aos seus aductos de sódio  $[M+Na]^+$ . Os iões sodiados  $[M+Na]^+$ , são frequentemente observados, na análise de fosfolípidos por ESI-MS, mesmo sem a adição de sódio. As fosfatidilcolinas (PC), as fosfatidiletanolaminas (PE) e as esfingomielinas (SM) ionizam formando iões positivos com maior abundância relativa. É ainda de referir que a análise do perfil lipídico no modo directo positivo tem como desvantagem o facto de alguns iões, de PE e de PC poderem estar sobrepostas.

No capítulo 3, referimos alguns dos iões de maior abundância relativa de cada classe aquando da apresentação do espectro de lípidos totais de DCs imaturas e maduras no modo positivo. Assim, e após análise da Figura 44, é de referir não observarmos diferenças significativas na comparação dos espectros de ESI-MS dos lípidos totais extraídos das DCs nas várias condições.

### ***Análise dos espectros de ESI-MS no modo negativo***

As fosfatidilserina PS, as fosfatidilglicerol PG e as fosfatidilinositol PI ionizam formando iões negativos de maior abundância. Na Figura 45 apresentamos o espectro de lípidos totais de DCs nas várias condições no modo negativo, onde observamos a presença das diferentes classes lipídicas (PS, PG e PI e ceramidas).



**Figura 45: Espectro de ESI-MS de fosfolípidos totais extraídos de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS), expostas a alergénios (DNFB) e a irritantes (SDS) no modo negativo**

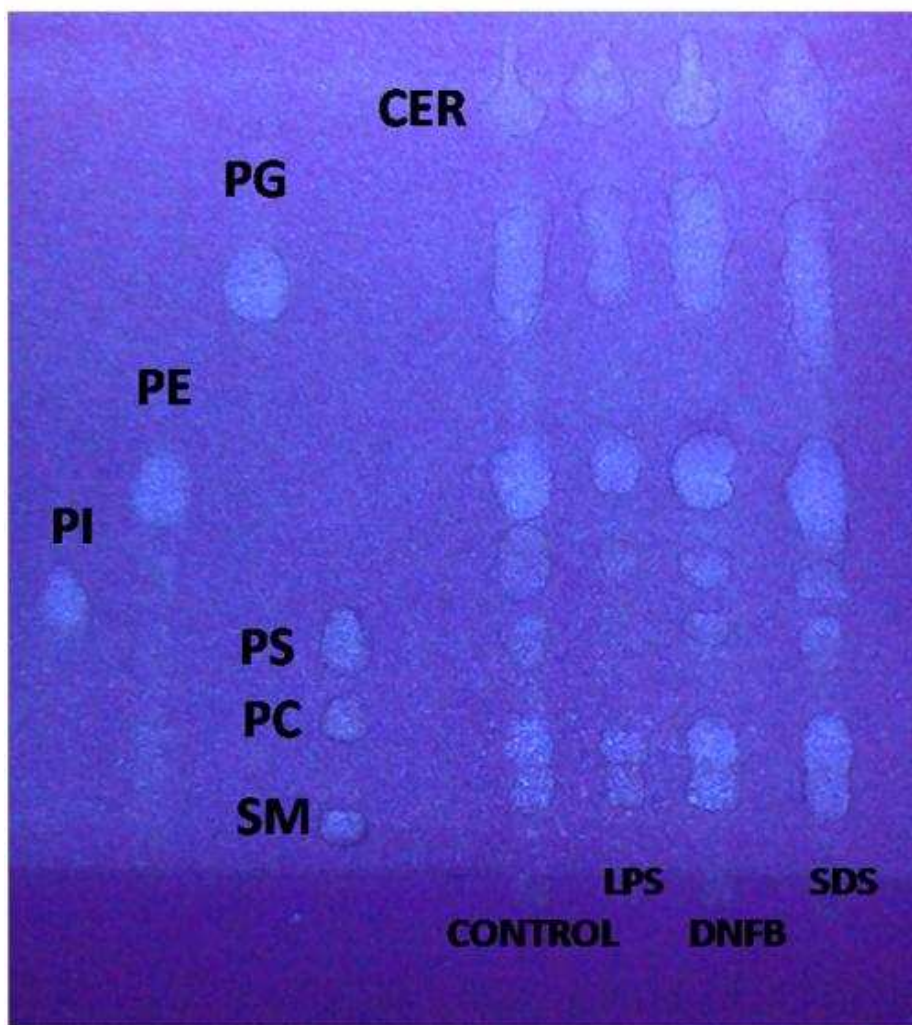
No capítulo 3, aquando da comparação entre o perfil lipídico total de DCs imaturas e maduras, no modo negativo, apontámos como diferença o aumento das ceramidas. Nesta fase, e após análise do extracto lipídico total de DCs nas várias condições no modo negativo, verificamos que quer no DNFB quer no SDS esta diferença não é notável.

Assim, e tal como foi efectuado para as DCs imaturas e maduras, também para as DCs expostas a DNFB e SDS, prosseguimos a uma separação das classes por cromatografia de camada fina, para posterior análise por espectrometria de massa.

#### ***4.3 Análise das diferentes classes de lípidos por TLC e ESI-MS e ESI-MS/MS***

Tal como podemos concluir do capítulo 3, a separação das classes lipídicas por cromatografia de camada fina, traz-nos muita informação, além daquela que já tínhamos através da aquisição dos espectros de MS do fosfolípidos.

Como foi explicado no capítulo 3 a cromatografia de camada fina, baseia-se na afinidade entre as diferentes classes lipídicas e a mistura de eluição. Isto porque, as classes lipídicas variam em termos de polaridade. Assim, os lípidos mais polares têm menos afinidade com a mistura de eluição e portanto eluem mais lentamente, tendo um  $R_f$  menor.



**Figura 46:** Placa de sílica após realização de TLC e revelação com primulina.

Podemos visualizar padrões das diferentes classes (SM, PC, PS, PI, PE, PG e ceramidas) e separação das classes lipídicas das DCs imaturas (control), maduras (LPS), expostas a alergénios (DNFB) e a irritantes (SDS).

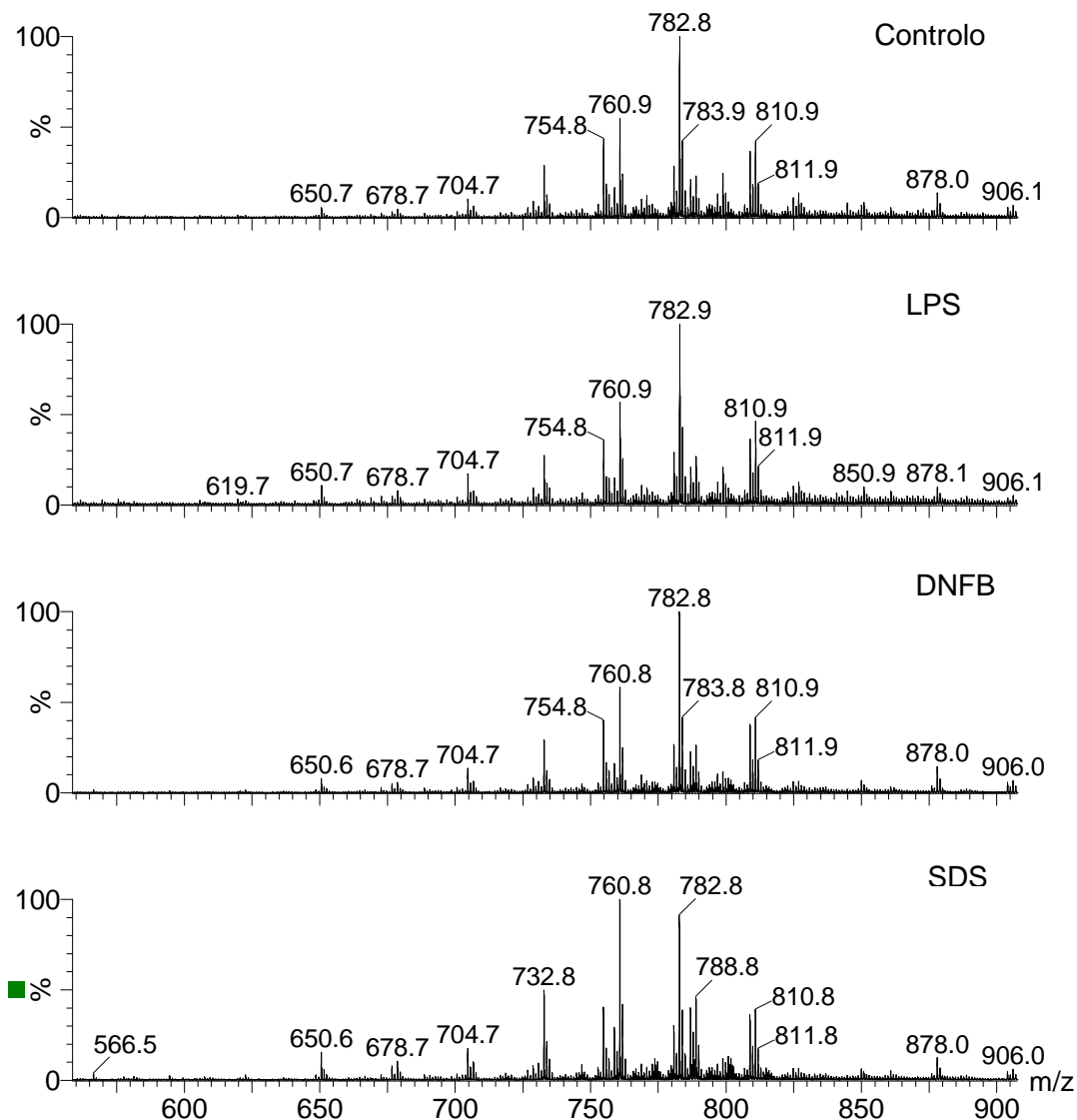
Após obter os extractos lipídicos parciais, após isolamento de cada classe por TLC, foram realizados espectros de ESI-MS de cada classe e posteriormente espectros de MS/MS dos iões, de forma a confirmar inequivocamente a sua classe e identificar cada uma das espécies.

#### ***Análise dos espectros de ESI-MS e ESI-MS/MS no modo positivo***

Por já termos apresentado no capítulo anterior a identificação das espécies, a caracterização e a fragmentação de todas as classes lipídicas observadas nas DCs, no capítulo anterior, neste capítulo, vamos incidir apenas nas possíveis diferenças entre as DCs sujeitas aos vários estímulos.

#### 4.3.1 Fosfatidilcolina

Em seguida, apresentamos o espectro da classe das fosfatidilcolinas separadas por TLC, de DCs imaturas (controle), maduras (LPS), expostas a alérgenos (DNFB) e a irritantes (SDS).



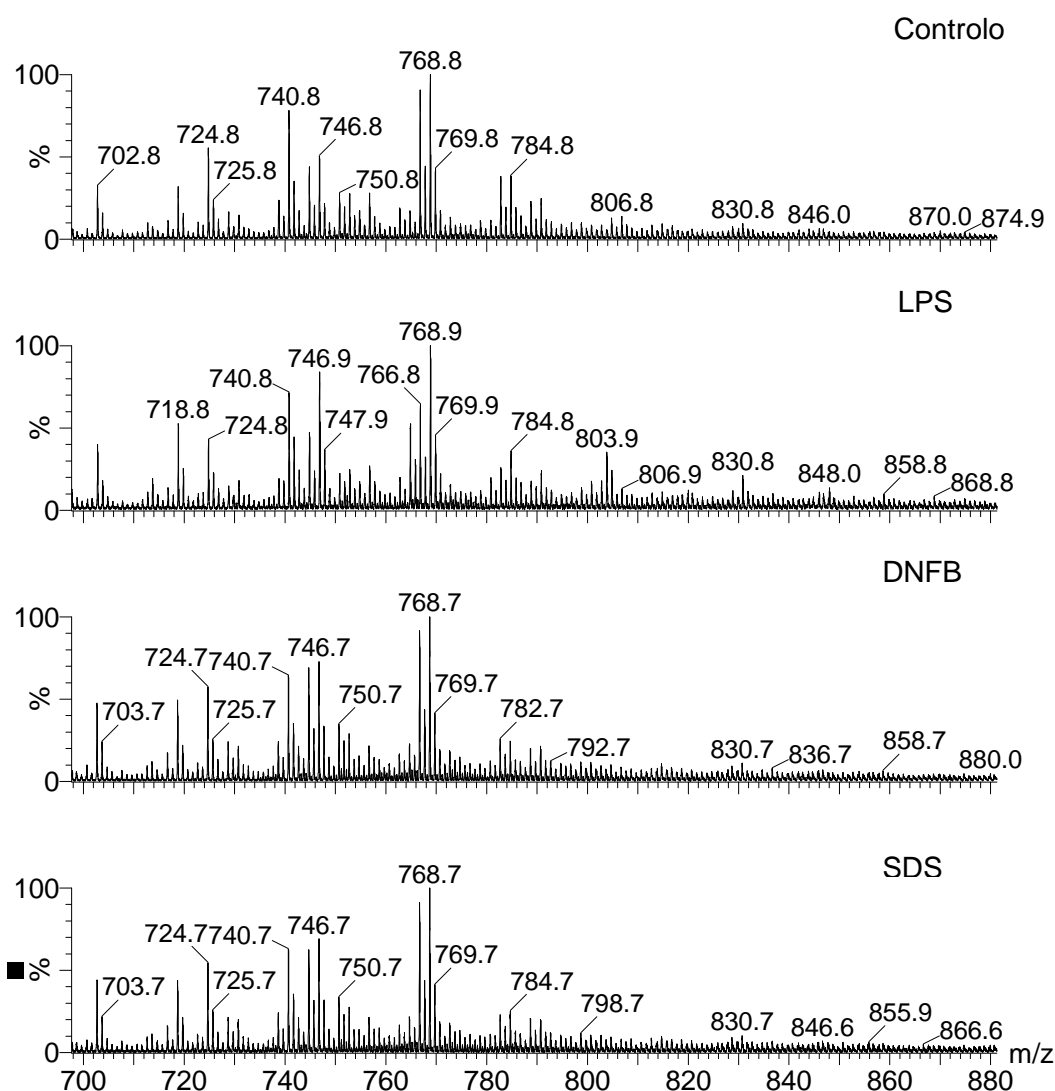
**Figura 47: Espectro de ESI-MS de fosfatidilcolinas separados por TLC de células dendríticas imaturas (controle), maduras (LPS), expostas a alérgenos (DNFB) e a irritantes (SDS) no modo positivo.**

Nos espectros das fosfatidilconlinas separadas por TLC observamos o mesmo perfil lipídico nas DCs em diferentes condições. Todas as espécies encontradas foram já apresentadas na Tabela 1, apresentada no capítulo 3

#### 4.3.2 Fosfatidiletanolaminas

O perfil das PE nas DCs foi estudado e apresentado no capítulo 3, para DCs imaturas e maduras, onde não observamos diferenças significativas.

Na Figura 48 apresentamos os espectros de ESI-MS desta classe após separação por TLC, de DCs imaturas (controlo), maduras (LPS), expostas a alergénios (DNFB) e a irritantes (SDS).



**Figura 48: Espectro de ESI-MS de fosfatidietanolaminas separados por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS), expostas a alergénios (DNFB) e a irritantes (SDS no modo positivo**

A classe das etanolaminas é tal como as fosfatidilcolinas, uma das classes mais abundantes nas células, mas por certos iões estarem escondidos pelas colinas por estas

ultimas serem mais facilmente ionizaveis, o espectro de lípidos totais não forneceu tanta informação quanta a obtida através da análise do espectro após a separação por TLC das PE. Esta informação foi apresentada na Tabela 2 do capítulo 3.

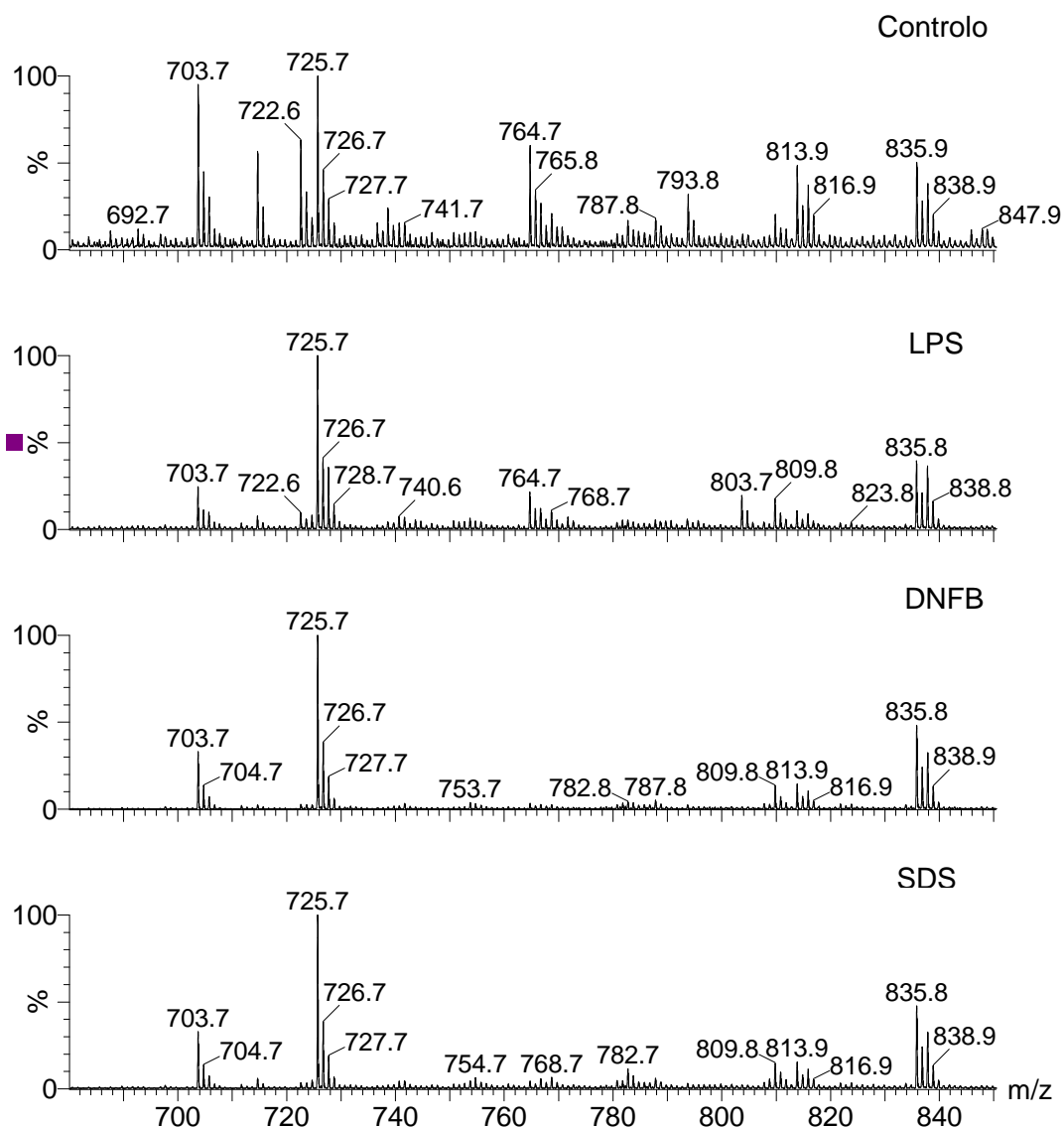
O perfil das PE não sofre alterações significativas com a exposição quer a alergenios quer a irritantes.



### 4.3.3 Esfingomielina

O perfil das SM das DCs foi estudado e apresentado no capítulo 3, onde se observaram alterações deste perfil após maturação.

Na Figura 49 visualizamos as diferentes esfingomielinas pertencentes ao perfil lipídico das DCs em diferentes condições.



**Figura 49: Espectro de ESI-MS de esfingomielinas separados por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS), expostas a alergénios (DNFB) e a irritantes (SDS), no modo positivo.**

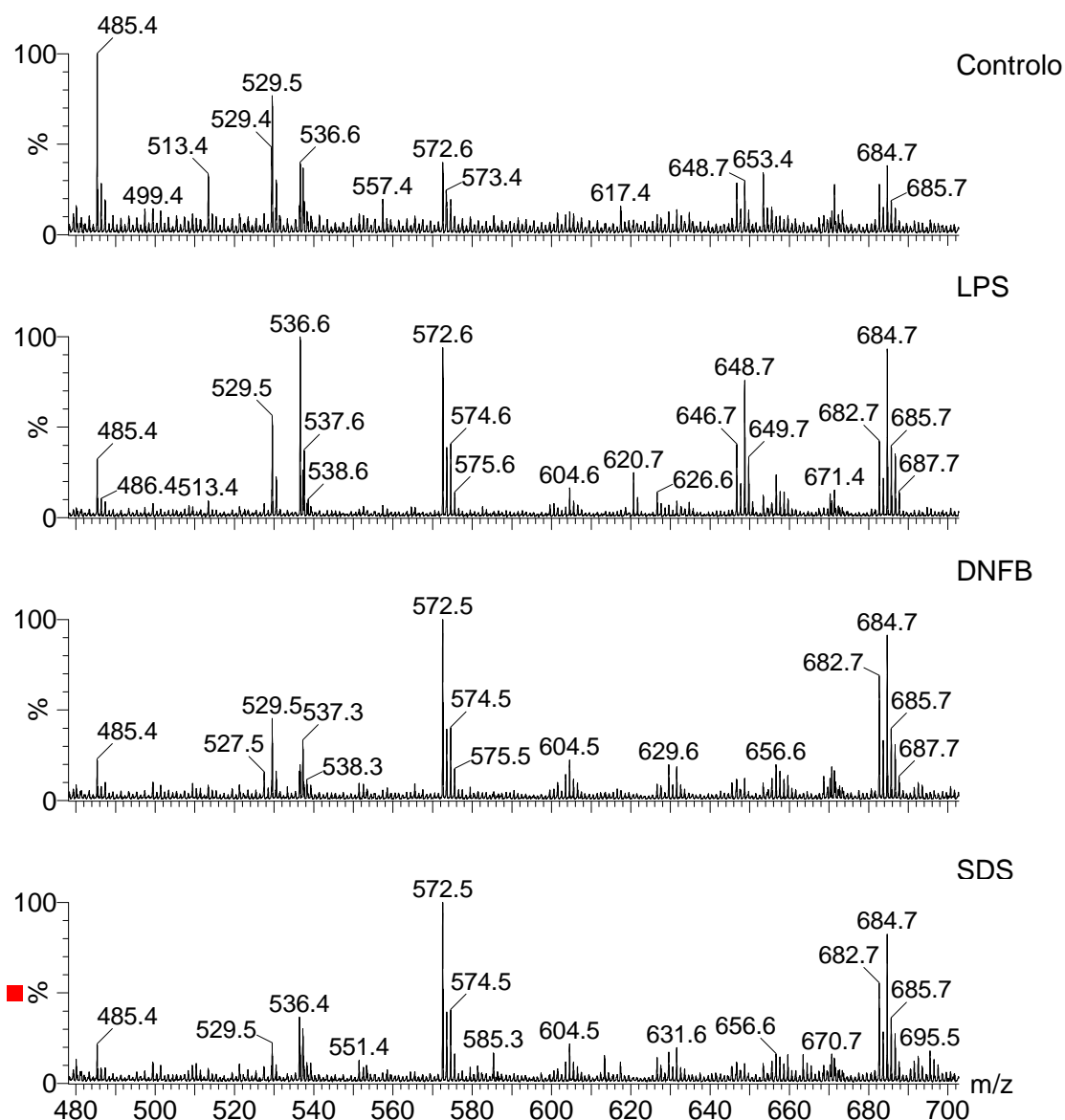
No capítulo 3 referimos o decréscimo da SM d18.1/16:0 ( $m/z$  703), da SM d18.1/24:1 ( $m/z$  813), e da d18.1/24:0 ( $m/z$  815) em DCs maduras. Os espectros correspondentes a

DCs expostas a alergénios e a irritantes também apresentam a mesma alteração, isto é um decréscimo dos mesmos iões, ainda que não tão intensamente.

### ***Análise dos espectros de ESI-MS e ESI-MS/MS no modo negativo***

#### **4.3.4 Ceramida**

No capítulo 3, apresentamos o aumento de alguns iões das ceramidas, após maturação. Na Figura 50 apresentamos o perfil de ceramidas pertencentes a DCs em diferentes condições.

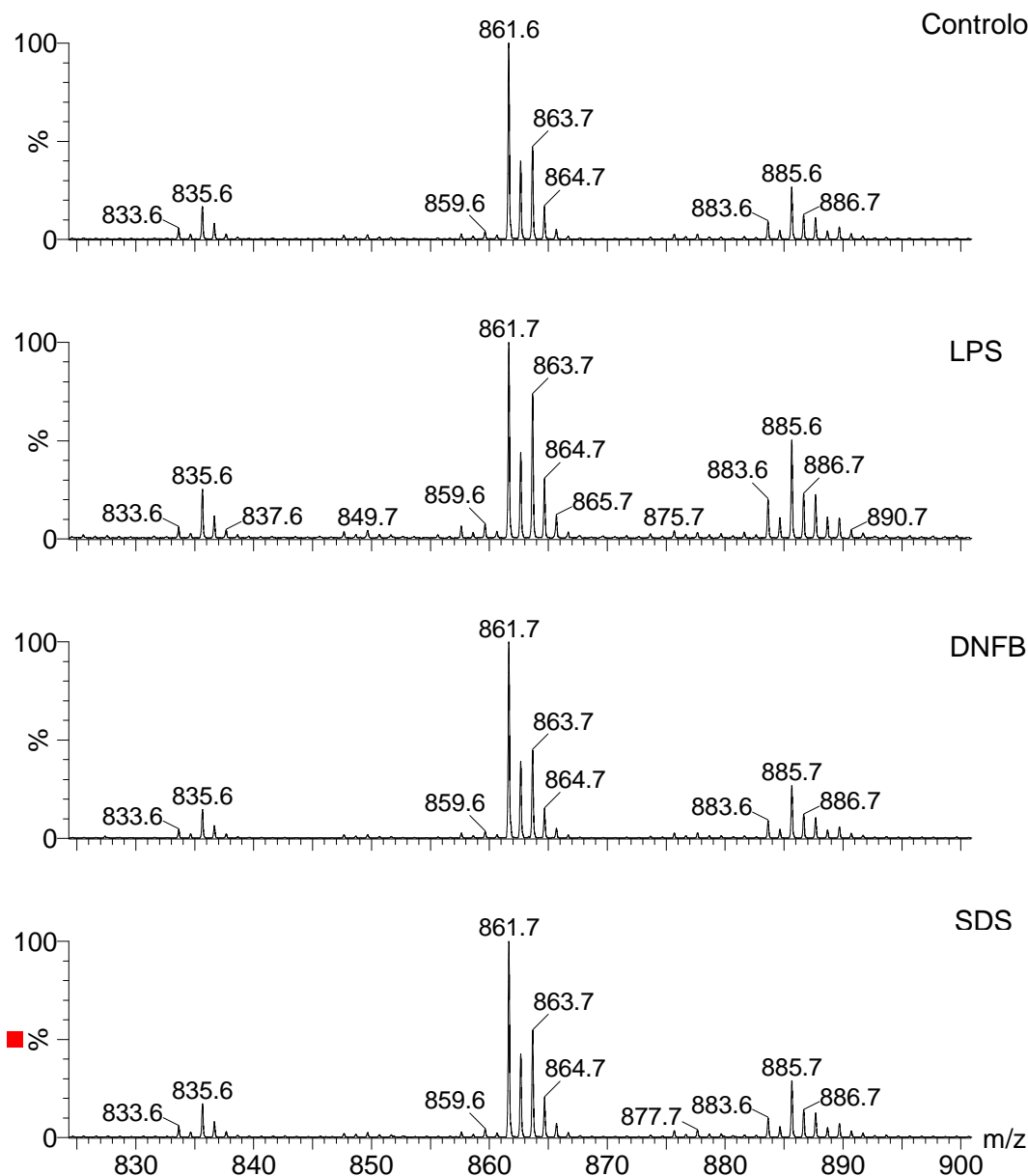


**Figura 50: Espectro de ESI-MS de ceramidas separadas por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS), expostas a alergénios (DNFB) e a irritantes (SDS), no modo negativo.**

Tal como tínhamos referido no capítulo 3, as ceramidas são essencialmente visíveis no espectro de DCs maduras, portanto podemos falar numa acentuada alteração do perfil de ceramidas nas DCs maduras. Relativamente aos espectros das DCs expostas a DNFB e a SDS, este aumento não é tão evidente, mas também podemos falar de uma alteração do perfil das ceramidas. Especialmente se tivermos em atenção os aductos de cloro a  $m/z$  572 (cer d18:1/16:0),  $m/z$  682 e 684 ( cer d 18:1/ 24:1 e cer d 18:1/24:0, respectivamente).

#### 4.3.5 Fosfatidilinositol

Na Figura 51 apresentamos o perfil das PI, observado nas DCs em diferentes condições.

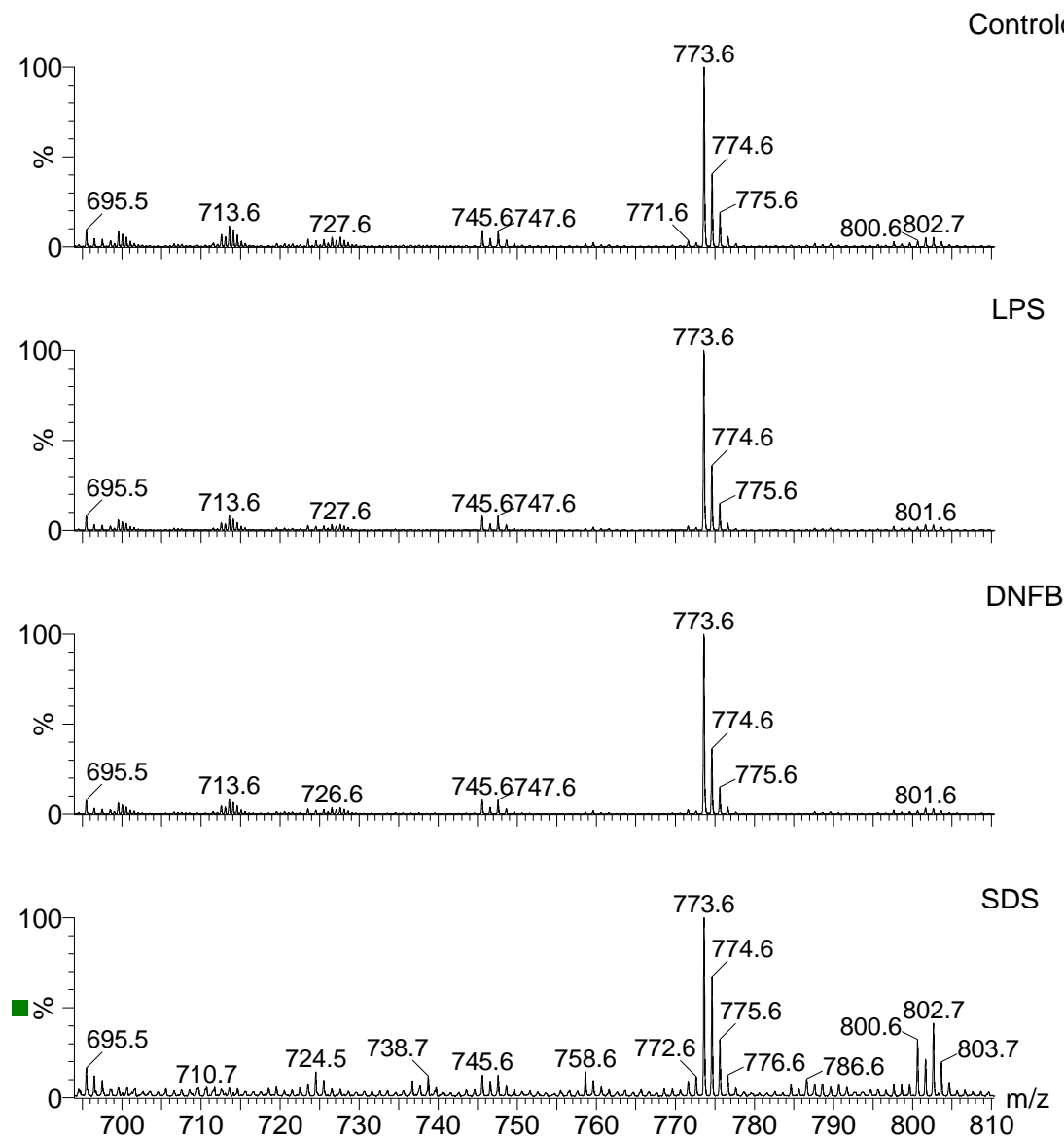


**Figura 51: Espectro de ESI-MS de fosfatidilinositol separadas por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS), expostas a alergénios (DNFB) e a irritantes (SDS), no modo negativo.**

Tal como verificamos no capítulo 3, para DCs imaturas e maduras, também relativamente às DCs expostas a alergénios e a irritantes, podemos dizer que não há diferenças significativas.

#### 4.3.6 Fosfatidilglicerol

O perfil de PG em DCs nas diferentes condições está apresentado na Figura 52.

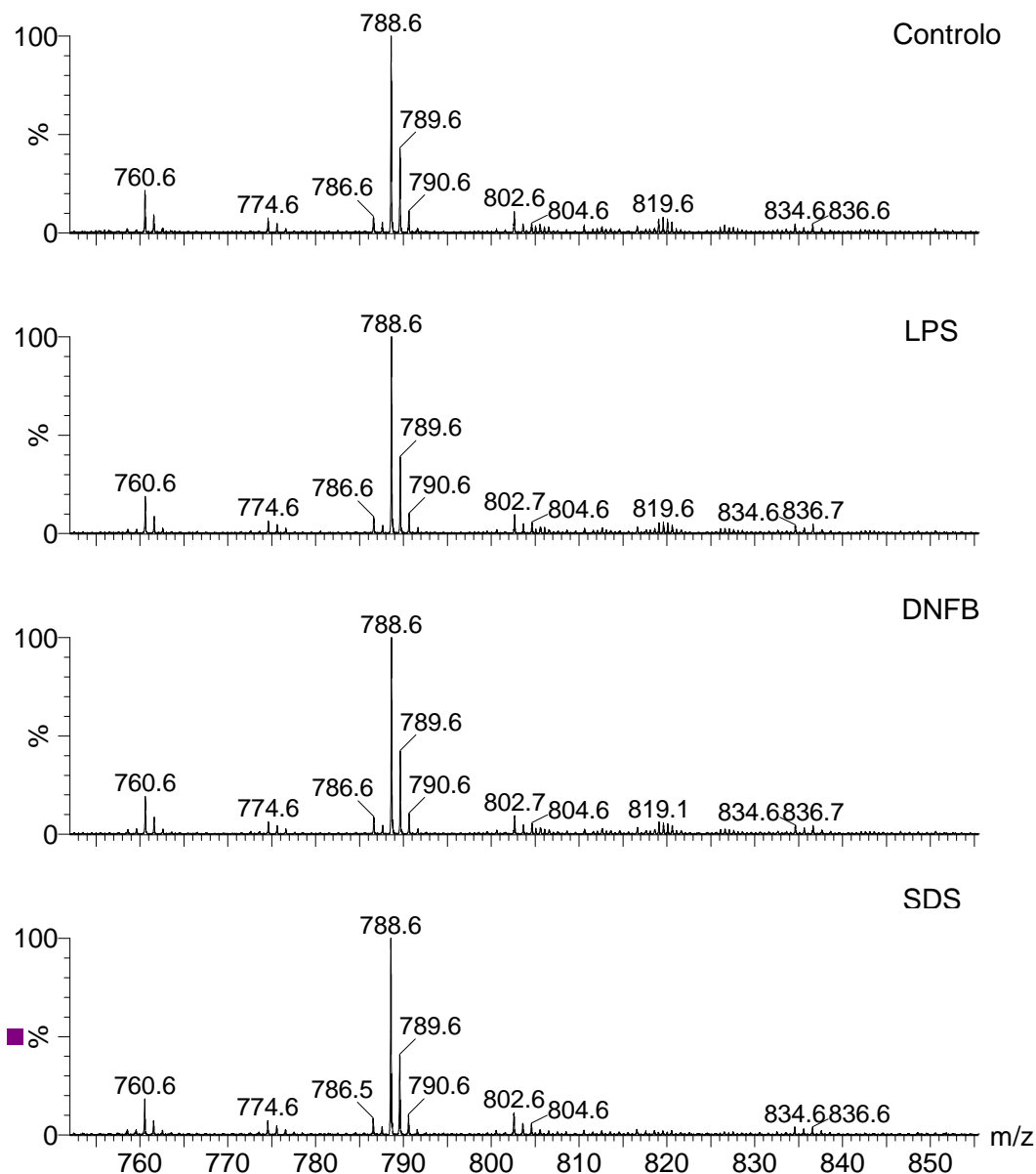


**Figura 52: Espectro de ESI-MS de fosfatidilglicerol separadas por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS), expostas a alergénios (DNFB) e a irritantes (SDS), no modo negativo.**

No capítulo 3 concluímos não observar diferenças significativas entre DCs imaturas e maduras relativamente ao perfil das PG. Podemos agora estender esta conclusão a DCs expostas a alergénios e irritantes.

#### 4.3.7 Fosfatidilserina

Por ultimo, reflectindo a ordem que seguimos no capítulo 3, a classe das PS. A Figura 53 representa os espectros de ESI-MS das PS encontradas nas DCs em diferentes condições.



**Figura 53: Espectro de ESI-MS de fosfatidilserinas separadas por TLC de células dendríticas imaturas (controlo) e maduras (LPS), expostas a alergénios (DNFB) e a irritantes (SDS), no modo negativo.**

Na classe das PS, as DCs expostas a alergénios e a irritantes não apresentaram diferenças significativas quer quando comparadas entre si, quer quando comparadas com DCs imaturas e/ou maduras.

#### **4.4 Conclusões**

Neste capítulo pretendíamos observar alterações do perfil lipídico em DCs expostas a alergénios (DNFB) e quando expostas a irritantes (SDS).

Nos espectros de lípidos totais, quer no positivo quer no negativo, não fomos capazes de definir alterações significativas.

No entanto após separação das classes lipídicas por TLC, obtivemos diferenças significativas no perfil das esfingomielinas e das ceramidas. É de referir que estas alterações são menos evidentes que as apresentadas nos mesmos perfis de DCs maduras. Deverão ser realizadas análise mais detalhadas das espécies menos abundantes de cada classe, provavelmente por LC-MS e MS/MS, após separação por TLC.

As restantes classes lipídicas não apresentaram diferenças significativas nos perfis, mesmo após separação por cromatografia de camada fina.

## **Capitulo 5**

### **Conclusões**



## 5 Conclusões

A espectrometria de massa com ionização por electrospray, demonstrou ser um método de análise muito valioso para a análise do perfil lipídico de células dendríticas. Os resultados obtidos permitiram identificar diferenças no perfil lipídico total entre células dendríticas imaturas e maduras, em que a maturação foi induzida pelo LPS. Estas diferenças foram obtidas aquando da análise do extracto lipídico total apenas no modo negativo, permitindo identificar o aumento da abundância relativa de ceramidas nos extractos de células dendríticas maduras, nomeadamente as ceramidas d18:1/16:0 de m/z 536, a cer d18:1/24:1 de m/z 646 e a cer d18:1/24:0 de m/z 648. A análise das diferentes classes lipídicas após separação por TLC, confirmou a variação do perfil das ceramidas, com o aumento das ceramidas referidas e curiosamente, uma alteração do perfil das esfingomielinas, analisadas no modo positivo, não visível nos espectros dos extractos totais, por estarem em sobreposição com iões correspondentes a fosfolípidos de classes de glicerofosfatidilcolinas, e /ou glicerioetanolaminas. Assim, observou-se uma diminuição da abundância relativa dos iões  $[MH]^+$  das esfingomielinas SM d18:1/16:0 (de m/z 703), SM d18:1/24:1 (m/z 813), SM d18:1/24: (m/z 815 ).

Não se observaram variações aparentes nas outras classes de fosfolípidos, PC, PE, PI, PG e PS quer na análise dos extractos totais quer após a análise dos extractos obtidos por separação das classes destes fosfolípidos.

Os extractos lipídicos das células dendríticas quando expostas a um irritante (SDS) e a um alergénio (DNFB) mostraram uma variação do perfil semelhante ao observado para o LPS, mas as variações observadas nas abundâncias relativas dos iões referidos, foram menores do que as dos extractos de células maduras.

Em termos gerais podemos referir que a estimulação das DCs com componentes de microorganismos e com químicos indutores de dermatite de contacto altera de um modo significativo, o perfil lipídico das DCs.

## **Capitulo 6**

### **Referências Bibliográficas**

## Referências Bibliográficas

- Bang, D. Y., E. J. Ahn, et al. (2007). "Shotgun analysis of phospholipids from mouse liver and brain by nanoflow liquid chromatography/tandem mass spectrometry." Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **852**(1-2): 268-277.
- Bayir, H., V. A. Tyurin, et al. (2007). "Selective early cardiolipin peroxidation after traumatic brain injury: An oxidative lipidomics analysis." Annals of Neurology **62**(2): 154-169.
- Billah, M. M. and J. C. Anthes (1990). "THE REGULATION AND CELLULAR FUNCTIONS OF PHOSPHATIDYLCHOLINE HYDROLYSIS." Biochemical Journal **269**(2): 281-291.
- Bligh, E. G. and W. J. Dyer (1959). "A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION." Canadian Journal of Biochemistry and Physiology **37**(8): 911-917.
- Bluml, S., S. Kirchberger, et al. (2005). "Oxidized phospholipids negatively regulate dendritic cell maturation induced by TLRs and CD40." Journal of Immunology **175**(1): 501-508.
- Domingues, P., M. R. M. Domingues, et al. (2001). "Characterization of sodiated glycerol phosphatidylcholine phospholipids by mass spectrometry." Rapid Communications in Mass Spectrometry **15**(10): 799-804.
- Edmond de Hoffmann, V. S., Ed. (2007). Mass Spectrometry Principles and Applications, John Wiley & Sons Ltd.
- Fonteh, A. N., R. J. Harrington, et al. (2006). "Identification of disease markers in human cerebrospinal fluid using lipidomic and proteomic methods." Disease Markers **22**(1-2): 39-64.
- Fuchs, B., E. Schiller, et al. (2005). "The phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ratio in human plasma is an indicator of the severity of rheumatoid arthritis: Investigations by P-31 NMR and MALDI-TOF MS." Clinical Biochemistry **38**(10): 925-933.
- Fuchs, B., J. Schiller, et al. (2007). "A direct and simple method of coupling matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to thin-layer chromatography (TLC) for the analysis of phospholipids from egg yolk." Analytical and Bioanalytical Chemistry **389**(3): 827-834.
- Gundacker, N. C., V. J. Haudek, et al. (2009). "Cytoplasmic Proteome and Secretome Profiles of Differently Stimulated Human Dendritic Cells." Journal of Proteome Research **8**(6): 2799-2811.
- Han, P. X. (2009, June 15). "Lipidomics.SciTopics." Retrieved january 11,2010.
- Han, X. L. (2002). "Characterization and direct quantitation of ceramide molecular species from lipid extracts of biological samples by electrospray ionization tandem mass spectrometry." Analytical Biochemistry **302**(2): 199-212.

## Referências Bibliográficas

- Han, X. L. and R. W. Gross (2005). "Shotgun lipidomics: Electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples." Mass Spectrometry Reviews **24**(3): 367-412.
- Haynes, C. A., J. C. Allegood, et al. (2009). "Sphingolipidomics: Methods for the comprehensive analysis of sphingolipids." Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **877**(26): 2696-2708.
- Hein, E. M., L. M. Blank, et al. (2009). "Glycerophospholipid profiling by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry using exact mass measurements and multi-stage mass spectrometric fragmentation experiments in parallel." Rapid Communications in Mass Spectrometry **23**(11): 1636-1646.
- Holopainen, J. M., J. Lemmich, et al. (2000). "Dimyristoylphosphatidylcholine/C16 : 0-ceramide binary liposomes studied by differential scanning calorimetry and wide- and small-angle X-ray scattering." Biophysical Journal **78**(5): 2459-2469.
- Hsu, F. F. and J. Turk (2000). "Characterization of phosphatidylethanolamine as a lithiated adduct by triple quadrupole tandem mass spectrometry with electrospray ionization." J Mass Spectrom **35**(5): 595-606.
- Hsu, F. F. and J. Turk (2000). "Characterization of phosphatidylinositol, phosphatidylinositol-4-phosphate, and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate by electrospray ionization tandem mass spectrometry: A mechanistic study." Journal of the American Society for Mass Spectrometry **11**(11): 986-999.
- Hsu, F. F. and J. Turk (2002). "Characterization of ceramides by low energy collisional-activated dissociation tandem mass spectrometry with negative-ion electrospray ionization." Journal of the American Society for Mass Spectrometry **13**(5): 558-570.
- Hsu, F. F. and J. Turk (2007). "Differentiation of 1-O-alk-1'-enyl-2-acyl and 1-O-alkyl-2-acyl glycerophospholipids by multiple-stage linear ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization." Journal of the American Society for Mass Spectrometry **18**(11): 2065-2073.
- Hsu, F. F. and J. Turk (2009). "Electrospray ionization with low-energy collisionally activated dissociation tandem mass spectrometry of glycerophospholipids: Mechanisms of fragmentation and structural characterization." Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **877**(26): 2673-2695.
- Hsu, F. F., J. Turk, et al. (2007). "Structural characterization of phosphatidyl-myo-inositol mannosides from Mycobacterium bovis Bacillus Calmette Guerin by multiple-stage quadrupole ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization. I. PIMs and lyso-PIMs." Journal of the American Society for Mass Spectrometry **18**(3): 466-478.
- Hu, C. X., R. van der Heijden, et al. (2009). "Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery." Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **877**(26): 2836-2846.
- Kanto, T., P. Kalinski, et al. (2001). "Ceramide mediates tumor-induced dendritic cell apoptosis." Journal of Immunology **167**(7): 3773-3784.

- Kim, H., E. Ahn, et al. (2008). "Profiling of human urinary phospholipids by nanoflow liquid chromatography/tandem mass spectrometry." Analyst **133**(12): 1656-1663.
- Kim, H., H. K. Min, et al. (2009). "Quantitative analysis of phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines in urine of patients with breast cancer by nanoflow liquid chromatography/tandem mass spectrometry." Analytical and Bioanalytical Chemistry **393**(6-7): 1649-1656.
- Kiyotaka Nakagawa, J.-H. O., Ohki Higuchi, Tsuyoshi Tsuzuki, Shinichi Oikawa, Haruhisa Otani, Masatoshi Mune, Hua Cai and Teruo Miyazawa (2005). "Ion-trap tandem mass spectrometric analysis of Amadori-glycated phosphatidylethanolamine in human plasma with or without diabetes." Journal of Lipid Research **46**: 2514-2524.
- Lambrecht, B. N., C. Hoogsteden, et al. (2001). "Dendritic cells as regulators of the immune response to inhaled allergen: Recent findings in animal models of asthma." International Archives of Allergy and Immunology **124**(4): 432-446.
- Mackman, N. (2003). "How do oxidized phospholipids inhibit LPS signaling?" Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology **23**(7): 1133-1136.
- Manicke, N. E., J. M. Wiseman, et al. (2008). "Desorption electrospray ionization (DESI) mass Spectrometry and tandem mass spectrometry (MS/MS) of phospholipids and sphingolipids: Ionization, adduct formation, and fragmentation." Journal of the American Society for Mass Spectrometry **19**(4): 531-543.
- Milne, S., P. Ivanova, et al. (2006). "Lipidomics: An analysis of cellular lipids by ESI-MS." Methods **39**(2): 92-103.
- Mueller, M., K. Brandenburg, et al. (2005). "Phospholipids inhibit lipopolysaccharide (LPS)-induced cell activation: A role for LPS-binding protein." Journal of Immunology **174**(2): 1091-1096.
- Ogiso, H., T. Suzuki, et al. (2008). "Development of a reverse-phase liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry method for lipidomics, improving detection of phosphatidic acid and phosphatidylserine." Analytical Biochemistry **375**(1): 124-131.
- Oresic, M., V. A. Hanninen, et al. (2008). "Lipidomics: a new window to biomedical frontiers." Trends in Biotechnology **26**(12): 647-652.
- Peterson, B. L. and B. S. Cummings (2006). "A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples." Biomedical Chromatography **20**(3): 227-243.
- Postle, A. D. (2009). "Phospholipid lipidomics in health and disease." European Journal of Lipid Science and Technology **111**(1): 2-13.
- Pulfer, M. and R. C. Murphy (2003). "Electrospray mass spectrometry of phospholipids." Mass Spectrom Rev **22**(5): 332-364.
- Pulfer, M. and R. C. Murphy (2003). "Electrospray mass spectrometry of phospholipids." Mass Spectrometry Reviews **22**(5): 332-364.

## Referências Bibliográficas

- Quehenberger, O., A. Armando, et al. (2008). "Lipidomics analysis of essential fatty acids in macrophages." Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids **79**(3-5): 123-129.
- Raith, K. and R. H. H. Neubert (1998). "Structural studies on ceramides by electrospray tandem mass spectrometry." Rapid Communications in Mass Spectrometry **12**(14): 935-938.
- Ramanadham, S., F. F. Hsu, et al. (1999). "Studies of the role of group VI phospholipase A(2) in fatty acid incorporation, phospholipid remodeling, lysophosphatidylcholine generation, and secretagogue-induced arachidonic acid release in pancreatic islets and insulinoma cells." Journal of Biological Chemistry **274**(20): 13915-13927.
- Ramanadham, S., F. F. Hsu, et al. (1998). "Electrospray ionization mass spectrometric analyses of phospholipids from rat and human pancreatic islets and subcellular membranes: Comparison to other tissues and implications for membrane fusion in insulin exocytosis." Biochemistry **37**(13): 4553-4567.
- Reis, A., M. R. M. Domingues, et al. (2005). "Separation of peroxidation products of diacyl-phosphatidylcholines by reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry." Biomedical Chromatography **19**(2): 129-137.
- Reis, A., P. Domingues, et al. (2004). "Fragmentation study of short-chain products derived from oxidation of diacylphosphatidylcholines by electrospray tandem mass spectrometry: identification of novel short-chain products." Rapid Communications in Mass Spectrometry **18**(23): 2849-2858.
- Reis, A., P. Domingues, et al. (2004). "Tandem mass spectrometry of intact oxidation products of diacylphosphatidylcholines: evidence for the occurrence of the oxidation of the phosphocholine head and differentiation of isomers." Journal of Mass Spectrometry **39**(12): 1513-1522.
- Sathaporn, S. and O. Eremin (2001). "Dendritic cells (I): biological functions." Journal of the Royal College of Surgeons of Edinburgh **46**(1): 9-19.
- Simoes, C., V. Simoes, et al. (2008). "Determination of the fatty acyl profiles of phosphatidylethanolamines by tandem mass spectrometry of sodium adducts." Rapid Communications in Mass Spectrometry **22**(20): 3238-3244.
- Szatmari, I. and L. Nagy (2008). "Nuclear receptor signalling in dendritic cells connects lipids, the genome and immune function." Embo Journal **27**(18): 2353-2362.
- Taguchi, R., J. Hayakawa, et al. (2000). "Two-dimensional analysis of phospholipids by capillary liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry." Journal of Mass Spectrometry **35**(8): 953-966.
- Vietzke, J. P., O. Brandt, et al. (2001). "Comparative investigation of human stratum corneum ceramides." Lipids **36**(3): 299-304.
- Watson, A. D. (2006). "Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems." Journal of Lipid Research **47**(10): 2101-2111.
- Wenk, M. R. (2005). "The emerging field of lipidomics." Nature Reviews Drug Discovery **4**(7): 594-610.

- Wolf, C. and P. J. Quinn (2008). "Lipidomics: Practical aspects and applications." Progress in Lipid Research **47**(1): 15-36.
- Zehethofer, N. and D. M. Pinto (2008). "Recent developments in tandem mass spectrometry for lipidomic analysis." Analytica Chimica Acta **627**(1): 62-70.